

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

28 JUN 2004

(43) 国際公開日
2003 年 7 月 17 日 (17.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/057251 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 39/395,
A61P 19/02, G01N 33/564
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/13650
- (22) 国際出願日: 2002 年 12 月 26 日 (26.12.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2001-400677
2001 年 12 月 28 日 (28.12.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和
酸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一
丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田村 忠史
(TAMURA, Tadafumi) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿
東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和酸酵工業株式
会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 内井 雅子
(UCHII, Masako) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡
長泉町下土狩 1 1 8 8 協和酸酵工業株式会社 医薬
総合研究所内 Shizuoka (JP). 須田 敏郎 (SUDA, Toshio)

[JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩
1 1 8 8 協和酸酵工業株式会社 医薬総合研究所
内 Shizuoka (JP). 三木 一郎 (MIKI, Ichiro) [JP/JP]; 〒
411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和
酸酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP).
田中 亨 (TANAKA, Akira) [JP/JP]; 〒329-0434 栃木県
河内郡南河内町祇園 3-1-3-D-303 Tochigi (JP).

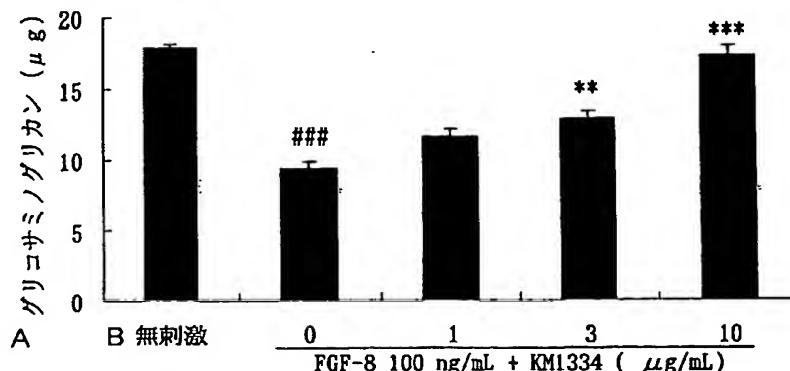
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: REMEDIES FOR ARTHRITIS

(54) 発明の名称: 関節炎の治療薬



A...GLYCOSAMINOGLYCAN (μg)
B...NO STIMULATION

(57) Abstract: It is intended to provide preventives or remedies for arthritis, cartilage protecting agents, joint destruction inhibitors and synovial proliferation inhibitors which contain as the active ingredient an anti-EGF-8 neutralizing antibody; diagnostics for arthritis which contain as the active ingredient an anti-EGF-8 antibody; and a method of judging arthritis by using the antibody.

[続葉有]

WO 03/057251 A1



— 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、抗FGF-8中和抗体を有効成分として含有する、関節炎の予防薬または治療薬、軟骨保護剤、関節破壊抑制剤、滑膜増殖抑制剤、および抗FGF-8抗体を有効成分として含有する関節炎の診断薬ならびに該抗体を用いた関節炎の判定方法を提供する。

明細書

関節炎の治療薬

技術分野

本発明は、抗FGF-8抗体を有効成分として含有する、関節炎の予防薬または治療薬、関節破壊抑制剤、軟骨保護剤、滑膜増殖抑制剤および関節炎の診断薬、ならびに該抗体を用いる関節炎の判定方法に関する。

背景技術

高齢者社会において関節症状を訴える人は確実に増加している。関節疾患の代表的な変形性関節症、あるいは関節リウマチといった疾患の早期診断やスクリーニング、あるいは患者の予後判定を的確に行うことは大変重要であり、その治療が多くの高齢者の生活の質を高めることになるが、未だに十分な診断や治療方法が確立していない。

関節軟骨は、関節の可動面を覆う少数の軟骨細胞と豊富な細胞外マトリックスに富んだ組織で、血管や神経は分布しておらず、主として関節内面を覆う滑膜から産生される滑液から栄養補給を受けている。また、無血管であるだけでなく、血管網に富む周囲組織からの血管の侵入に対して強い抵抗性を示す。軟骨細胞は、細胞外マトリックス合成、分解の両面を複雑に制御し、細胞外マトリックスの恒常性の維持に中心的役割を担っている。サイトカイン、成長因子などの化学的因子や荷重負荷などの力学的因子は軟骨細胞に作用し、細胞外マトリックス合成、分解の両者のバランスを変えることにより、細胞外マトリックス代謝に影響する。

変形性関節症は、加齢や機械的ストレスが原因となって、関節軟骨表面の崩壊と、これに伴う関節辺縁の新たな軟骨の増殖、関節の変形、適合性の破綻をきたし、さらに関節滑膜の炎症へと進行する。変形性関節炎は、関節の軟骨の遅行変性で、しばしば痛みと機能喪失とを特徴とする単関節炎疾患である (Manek M. J. and Lane N. E., Am. Fam. Physician, 61, 1795-1804, 2000)

関節リウマチでは、免疫異常や感染症が原因となって、滑膜に炎症性細胞が浸

潤し、さらに、血管新生に伴って滑膜線維芽細胞の増殖が亢進して、パニヌスと呼ばれる炎症性滑膜肉芽組織が形成される。パニヌスが形成されると、骨や軟骨の破壊が進み、関節に不可逆的な障害がもたらされる。骨や軟骨が破壊される過程では、多量に存在するコラーゲンやプロテオグリカンなどの種々の細胞外マトリックスが分解される。

変形性関節症あるいは関節リウマチなどの関節症において、滑膜炎および細胞外マトリックスの破壊が関節軟骨の機能喪失へつながってゆく。

変形性関節症と関節リウマチは、病因論的に全く異なる疾患であるが、関節軟骨破壊機構において多くの共通点を有する。関節滑液および滑膜・軟骨などの関節局所で多種類のマトリックスメタロプロテアーゼが産生・分泌され、関節局所にマトリックスメタロプロテアーゼが過剰に検出される。マトリックスメタロプロテアーゼは多種類の細胞外マトリックスを分解するため、このことが関節破壊の一因となっている。これらの産生は、炎症滑膜、マクロファージ、好中球のみならず軟骨細胞からも産生されるが、その産生は同じ関節局所において産生分泌される種々のサイトカイン、活性酸素、一酸化窒素、プロスタグランジン、成長因子等により調節されている。これらは滑膜細胞、軟骨細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼの産生を誘導して、細胞外マトリックスの分解を促進することも報告されている。

これらの報告から、変形性関節症や関節リウマチのほか、自己抗体の出現と免疫複合体の組織沈着による炎症性組織傷害が認められる原因不明の疾患で、関節症状が高率に出現する全身性エリテマトーデス、強直性関節炎、乾癬症患者に合併する滑膜増殖を伴い骨破壊にまで至る乾癬性関節炎、椎間板の細胞外マトリックスの破壊が認められる椎間板疾患、急性結晶性滑膜炎（痛風、偽痛風）といった関節炎疾患（広畑和志ら編 リウマチ学 同文書院 1989年）において、滑膜の増殖や軟骨破壊を抑制することにより治療することが可能と考えられる。

従来、関節リウマチの薬物療法は、主に関節の疼痛および炎症を軽減するために、種々の非ステロイド性抗炎症薬、プレドニゾロン等のステロイド剤やメトトレキサートをはじめとする抗リウマチ薬が使われている（治療，78，3553-3558，南山堂，1996）。変形性関節症においては、疼痛および炎症の除去のために、種々の非ステロイド性抗炎症薬や鎮痛剤や、関節注入剤ヒアルロン酸製剤等の投与

が行われてきた。軟骨破壊を抑制するヒアルロン酸は軟骨保護剤として使われている (Creamer P., J. Rheum., 20, 1461-1464, 1993、Arthritis Rheum., 43, 1905-1915, 2000)。また、理学療法や、骨切り術、人工関節置換術等の手術療法も行われている。全身性エリテマトーデスでは非ステロイド性抗炎症薬やプレドニゾロン等のステロイド剤、強直性関節炎には非ステロイド性抗炎症薬や抗リウマチ薬であるスルファサラジン、乾癬症患者に合併する滑膜増殖を伴い骨破壊にまで至る乾癬性関節炎では非ステロイド性抗炎症薬、抗リウマチ薬やステロイドの関節内注入、椎間板の細胞外マトリックスの破壊が認められる椎間板疾患では非ステロイド性抗炎症薬や鎮痛薬、急性結晶性滑膜炎では非ステロイド性抗炎症薬やコルヒチン等が使われている (広畑和志ら編 リウマチ学 同文書院 1989年) が、このような薬物療法は対症療法で、関節破壊を十分に抑制することは困難であった。

現在、関節リウマチの治療では、関節の破壊を少しでも予防しようとする積極的な治療法の選択が受け入れられつつあり、なるべく早い段階で関節リウマチと診断して、メトトレキサートをはじめとする抗リウマチ薬を、いかに適切に選択していくかがポイントとなっているが、十分な診断法はまだない。

生体内に存在する様々な成長因子の一種である線維芽細胞増殖因子 (以下、FGF と略す) は、血管内皮細胞に作用するヘパリン結合性増殖因子として知られている。また、FGFファミリーには19種類以上あり、FGF-2 (basic FGF) やFGF-1 (acidic FGF) 等が古くから知られている。FGF受容体は現在までに7種類見出されており、チロシンキナーゼを細胞内領域にコードしている。

FGF-8は、アンドロジェン誘導増殖因子 (AIGF) として、性ホルモン依存的増殖を示すマウス乳癌細胞株SC-3 (Nakamura N. et al., J. Steroid Biochem., 27, 459-464, 1987) の培養上清中より単離された因子で、アンドロジェン刺激により誘導産生され、オートクライン的にSC-3細胞を増殖させる増殖因子である (Tanaka A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8928-8932, 1992)。FGF-8は、前立腺癌の細胞や繊維芽細胞の増殖を促進させることが報告されている (Tanaka A. et al., FEBS Lett., 363, 226-230, 1995)。FGF-8はFGFレセプター-2IIIc、FGFレセプター-3IIIc、FGFレセプター-4の3種のレセプターに結合することが報告されている (Ornitz D. M. et al., J. Biol. Chem., 271, 15292-

15297, 1996)。また、FGFの作用にはシンデカンなどの膜型ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの結合が不可欠である。ヘパラン硫酸との結合はFGFを安定的に局所に蓄積するためにも必要である。炎症などの組織改変の状況ではヘパラン硫酸が分解されることにより、細胞外マトリックスからFGFが遊離して、その活性を発揮すると考えられている。軟骨中にはFGF-2のような強い血管新生因子が含有されている (Sato H. et al., J. Biol. Chem., 273, 12307-12315, 1998)。また関節炎では滑膜細胞、軟骨細胞および侵入した炎症細胞が著しく高レベルのFGF-1やFGF-2を合成し (Sano H. et al., J. Cell Biol., 110, 1417-1426, 1990、Remmers E. F., Growth factors, 2, 179-188, 1990)、リウマチ患者の関節液中のFGF-2濃度は、関節症状と相関する (Manabe N. et al., Rheumatology, 38, 714-720, 1999)。FGF-2は変形性関節症における骨棘形成に関与している (Uchino M. et al., Clin. Orthop., 377, 119-125, 2000)。これらの報告はFGF-1やFGF-2が関節炎に関与することを示している。

FGF-8ノックアウトマウスを用いた報告では、FGF-8が関節の発生段階に発現している (Haraguchi R. et al., Development, 127, 2471-2479, 2000; Lewandoski M. et al., Nat. Genet., 26, 460-463, 2000) とされるが、FGF-8の関節炎への関与は知られていない。

発明の開示

本発明の目的は、関節炎の予防薬または治療薬、関節破壊抑制剤、軟骨保護剤、滑膜増殖抑制剤および関節炎の診断薬、ならびに関節炎の判定方法を提供することにある。

発明の開示

本発明は以下の(1)～(51)を提供する。

(1) FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する関節炎の予防薬または治療薬。

(2) FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする(1)記載の医薬。

(3) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である(2)記載の医薬。

(4) ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451) である (3) 記載の医薬。

(5) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型相補性決定領域 (CDR) 移植抗体である (3) 記載の医薬。

(6) ヒト型キメラ抗体が、FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害するモノクローナル抗体の抗体重鎖可変領域 (VH) および抗体軽鎖可変領域 (VL)、ならびにヒト抗体の抗体重鎖定常領域 (CH) および抗体軽鎖定常領域 (CL) からなるヒト型キメラ抗体である (5) 記載の医薬。

(7) ヒト型キメラ抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型キメラ抗体である (6) 記載の医薬。

(a) VHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(b) VLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(c) VHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(8) ヒト型キメラ抗体が形質転換体KM3034 (FERM BP-7836) が生産するヒト型キメラ抗体である (7) 記載の医薬。

(9) ヒト型CDR移植抗体が、FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRならびにヒト抗体のCHおよびCLを含むヒト型CDR移植抗体である (5) 記載の医薬。

(10) ヒト型CDR移植抗体が、FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDR、ヒト抗体のVHおよびVLのフレームワーク領域 (FR)、ならびにヒト抗体のCHおよびCLからなるヒト型CDR移植抗体である (9) 記載の医薬。

(11) ヒト型CDR移植抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型CDR移植抗体である (9) または (10) 記載の医薬。

(a) VHのCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号7、8および9で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHのCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号7、8および9で示される

アミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(12) ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である(9)または(10)記載の医薬。

(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(13) ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である(9)または(10)記載の医薬。

(a) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列配列を含むヒト型CDR移植抗体

(14) ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植

抗体である (13) 記載の医薬。

(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号21で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号44で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号50で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(15) ヒト型CDR移植抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型CDR移植抗体である (9) または (10) 記載の医薬。

(a) 形質転換体KM8037 (FERM BP-8084) が生産するヒト型CDR移植抗体

(b) 形質転換体KM8035 (FERM BP-8082) が生産するヒト型CDR移植抗体

(c) 形質転換体KM8036 (FERM BP-8083) が生産するヒト型CDR移植抗体

(16) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、1本鎖抗体 (scFv)、2量体化可変領域 (V領域) 断片 (diabody)、ジスルフィド安定化V領域断片 (dsFv) および CDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である (3) 記載の医薬。

(17) FGF-8に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する関節炎の診断薬。

(18) FGF-8に特異的に結合する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることを特徴とする (17) 記載の診断薬。

(19) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である (18) 記載の診断薬。

(20) ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451) である (19) 記載の診断薬。

(21) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である (19) 記載の診断薬。

(22) ヒト型キメラ抗体が、FGF-8に特異的に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVL、ならびにヒト抗体のCHおよびCLからなるヒト型キメラ抗体である (21) 記載の診断薬。

(23) ヒト型キメラ抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型キメラ抗体である (22) 記載の診断薬。

(a) VHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(b) VLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(c) VHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(24) ヒト型キメラ抗体が形質転換体KM3034 (FERM BP-7836) が生産するヒト型キメラ抗体である (23) 記載の診断薬。

(25) ヒト型CDR移植抗体が、FGF-8に特異的に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRならびにヒト抗体のCHおよびCLを含むヒト型CDR移植抗体である (21) 記載の診断薬。

(26) ヒト型CDR移植抗体が、FGF-8に特異的に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDR、ヒト抗体のVHおよびVLのFR、ならびにヒト抗体のCHおよびCLからなるヒト型CDR移植抗体である (25) 記載の診断薬。

(27) ヒト型CDR移植抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型CDR移植抗体である (25) または (26) 記載の診断薬。

(a) VHのCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号7、8および9で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHのCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号7、8および9で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(28) ヒト型CDR移植抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型CDR移植抗体である (25) または (26) 記載の診断薬。

(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され

たアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(29) ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である(25)または(26)記載の診断薬。

(a) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(30) ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である(29)記載の診断薬。

(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号21で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号44で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号50で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(31) ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である(25)または(26)記載の診断薬。

(a) 形質転換体KM8037 (FERM BP-8084) が生産するヒト型CDR移植抗体

(b) 形質転換体KM8035 (FERM BP-8082) が生産するヒト型CDR移植抗体

(c) 形質転換体KM8036 (FERM BP-8083) が生産するヒト型CDR移植抗体

(32) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、1本鎖抗体(scFv)、2量体化V領域断片(diabody)、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv) およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である (19) 記載の診断薬。

(33) FGF-8に特異的に結合する抗体を用いて試料中のFGF-8を検出および/または定量することを特徴とする関節炎の判定方法。

(34) FGF-8に特異的に結合する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることを特徴とする (33) 記載の判定方法。

(35) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である (34) 記載の判定方法。

(36) ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451) である (35) 記載の判定方法。

(37) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である (35) 記載の判定方法。

(38) ヒト型キメラ抗体が、FGF-8に特異的に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVL、ならびにヒト抗体のCHおよびCLからなるヒト型キメラ抗体である (37) 記載の判定方法。

(39) ヒト型キメラ抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型キメラ抗体である (38) 記載の判定方法。

(a) VHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(b) VLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(c) VHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(40) ヒト型キメラ抗体が形質転換体KM3034 (FERM BP-7836) が生産するヒト型キメラ抗体である (39) 記載の判定方法。

(41) ヒト型CDR移植抗体が、FGF-8に特異的に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRならびにヒト抗体のCHおよびCLを含むヒト型CDR移植抗体である (37) 記載の判定方法。

(42) ヒト型CDR移植抗体が、FGF-8に特異的に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDR、ヒト抗体のVHおよびVLのFR、ならびにヒト抗体のCHおよびCLから

なるヒト型CDR移植抗体である (41) 記載の判定方法。

(43) ヒト型CDR移植抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型CDR移植抗体である (41) または (42) 記載の判定方法。

(a) VHのCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号7、8および9で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHのCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号7、8および9で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(44) ヒト型CDR移植抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型CDR移植抗体である (41) または (42) 記載の判定方法。

(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(45) ヒト型CDR移植抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型CDR移植

抗体である (41) または (42) 記載の判定方法。

(a) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列配列を含むヒト型CDR移植抗体

(46) ヒト型CDR移植抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型CDR移植抗体である (45) 記載の判定方法。

(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号21で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号44で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号50で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(47) ヒト型CDR移植抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型CDR移植抗体である (41) または (42) 記載の判定方法。

(a) 形質転換体KM8037 (FERM BP-8084) が生産するヒト型CDR移植抗体

(b) 形質転換体KM8035 (FERM BP-8082) が生産するヒト型CDR移植抗体

(c) 形質転換体KM8036 (FERM BP-8083) が生産するヒト型CDR移植抗体

(48) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、1本鎖抗体

(scFv)、2量体化V領域断片 (diabody)、ジスルフィド安定化V領域断片 (dsFv) およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である (35) 記載の判定方法。

(49) FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する関節破壊抑制剤。

(50) FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する軟骨保護剤。

(51) FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する滑膜増殖抑制剤。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬に用いられる抗体は、FGF-8に特異的に結合し、かつFGF-8の活性を阻害する抗体（以下、抗FGF-8中和抗体とも称する）であればいかなるものでもよく、例えば、FGF-8に対して中和活性を有する抗体および該抗体断片などがあげられる。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬に用いられる抗FGF-8中和抗体は、FGF-8に特異的に結合する抗体（以下、抗FGF-8抗体とも称する）の中から、FGF-8の活性を阻害する能力を有する抗体を選択することにより得ることができる。FGF-8の活性としては、FGF-8が有する生物活性であればいかなるものであってもよいが、具体的には、マウス乳癌細胞株SC-3 (Nakamura N. et al., J Steroid Biochem., 27, 459-464, 1987)、マウス線維芽細胞株NIH/3T3 (ATCC番号: CRL-1658)、もしくはヒト前立腺癌細胞株LNCaP (ATCC番号: CRL-1740) の増殖を促進する活性、滑膜細胞の増殖を促進する活性、軟骨細胞の細胞外マトリックスの分解を促進する活性、軟骨細胞からのマトリックスメタロプロテイナーゼ-3の産生を促進する活性をあげることができる。

抗FGF-8抗体は、公知の手段 (Harlow E. and Lane D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988、以下、アンチボデー・ア・ラボラトリー・マニュアルと記す) を用いて製造することができる。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用される抗FGF-8中和抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれも用いることができるが、モノクローナル抗体が好ましく用いられる。

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産される抗体、ヒト化抗体およびこれらの抗体の抗体断片をあげることができる。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用される、ハイブリドーマにより生産される抗FGF-8中和モノクローナル抗体は、具体的には以下に述べる方法によって製造することができる。

すなわち、FGF-8蛋白質を抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性をもつ形質細胞を誘導し、さらに、それと骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水よりFGF-8に特

異的に結合する抗体を分離、精製する。得られた抗体の中から、FGF-8の活性を阻害する抗体を選択する。このような抗FGF-8中和モノクローナル抗体として、特開平9-271391に記載されているマウスIgG1サブクラスに属するハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451) が生産するモノクローナル抗体KM1334があげられる。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用されるヒト化抗体としては、上記の抗FGF-8中和モノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものがあげられる。該抗体においては、抗原性が低く、血中半減期の延長されたものが、予防薬または治療薬として好ましい。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用されるヒト化抗体は、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域 (complementary determining region; 以下、CDRと略記する。) 移植抗体を包含する。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域 (以下、可変領域をV領域、重鎖可変領域をVHと称す) および軽鎖V領域 (以下、VLと称す) とヒト抗体の重鎖定常領域 (以下、定常領域をC領域、重鎖定常領域をCHと称す) およびヒト抗体の軽鎖C領域 (以下、CLと称す) とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用されるヒト型キメラ抗体は、抗FGF-8中和モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより得られる該抗体のH鎖およびL鎖をコードするcDNAから、VHおよびVLをコードするDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン (hIg) に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのものが好適であり、hIgGクラスに属する γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

FGF-8に特異的に結合しFGF-8の活性を阻害するヒト型キメラ抗体 (以下、抗FGF-8中和キメラ抗体とも称する) としては、FGF-8に特異的に結合しFGF-8の活性

を阻害するモノクローナル抗体のVHおよびVLとヒト抗体のVHおよびCLからなる抗FGF-8中和キメラ抗体、好ましくはVHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体、VLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体、およびVHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体があげられる。具体的には、抗体のVHが配列番号5記載のアミノ酸配列、CHがヒト γ 1サブクラスのアミノ酸配列からなり、抗体のVLが配列番号6記載のアミノ酸配列、CLがヒト κ クラスのアミノ酸配列からなるヒト型キメラ抗体KM3034およびKM3334があげられる。

ヒト型キメラ抗体KM3034を生産する形質転換体KM3034は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1-1 中央第6）に平成13年12月26日付けでFERM BP-7836として寄託されている。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト抗体に、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRをヒト以外の動物の抗体のCDR配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用されるヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのCDR配列で任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列をそれぞれ置換したV領域をコードするDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属する γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

FGF-8に特異的に結合しFGF-8の活性を阻害するヒト型CDR移植抗体（以下、抗FGF-8中和CDR移植抗体とも称する）としては、FGF-8に特異的に結合しFGF-8の活性を阻害するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRならびにヒト抗体のCHおよびCLを含むヒト型CDR移植抗体、FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDR、ヒト抗体のVHおよびVLのフレームワーク領

域（以下、FRと略す）、ならびにヒト抗体のCHおよびCLからなるヒト型CDR移植抗体があげられる。好ましくは、(a) VHのCDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号7、8、9で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体、(b) VLのCDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号10、11、12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体、(c) VHのCDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号7、8、9で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1、CDR2、CDR3がそれぞれ配列番号10、11、12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体があげられ、より好ましくは(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体、(b) VLが配列番号19で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体、(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体があげられる。さらに好ましくは(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体、(b) VLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体、(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体があげられる。具体的には、(a) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体、(b) VLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体、(c) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を

含み、かつVLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体があげられ、好ましくは(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、VLが21で示されるアミノ酸配列配列を含むヒト型CDR移植抗体、(b) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、VLが44で示されるアミノ酸配列配列を含むヒト型CDR移植抗体、(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、VLが50で示されるアミノ酸配列配列を含むヒト型CDR移植抗体があげられる。このようなヒト型CDR移植抗体として、VHが配列番号18記載のアミノ酸配列、CHがヒト γ 1サブクラスのアミノ酸配列からなり、VLが配列番号21記載のアミノ酸配列、CLがヒト κ クラスのアミノ酸配列からなるヒト型CDR移植抗体HV0LV6、HV0LV6/CHO、VHが配列番号18記載のアミノ酸配列、CHがヒト γ 1サブクラスのアミノ酸配列からなり、VLが配列番号44記載のアミノ酸配列、CLがヒト κ クラスのアミノ酸配列からなるヒト型CDR移植抗体HV0LV3-1/CHO、VHが配列番号18記載のアミノ酸配列、CHがヒト γ 1サブクラスのアミノ酸配列からなり、VLが配列番号50記載のアミノ酸配列、CLがヒト κ クラスのアミノ酸配列からなるヒト型CDR移植抗体HV0LV4-3/CHOがあげられる。

ヒト型CDR移植抗体HV0LV6を生産する形質転換体KM8037は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1-1中央第6）に平成14年6月20日付けでFERM BP-8084として、ヒト型CDR移植抗体HV0LV3-1を生産する形質転換体KM8036は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1-1中央第6）に平成14年6月20日付けでFERM BP-8083として、ヒト型CDR移植抗体HV0LV4-3を生産する形質転換体KM8035は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1-1中央第6）に平成14年6月20日付けでFERM BP-8082として、それぞれ寄託されている。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用される抗FGF-8中和抗体には抗体断片も含まれる。抗体断片は、FGF-8に特異的に結合しFGF-8の活性を阻害する抗体断片であるFab (fragment of antigen bindingの略)、F(ab')₂、Fab'、一本鎖抗体(single chain Fv; 以下、scFvと称す)、2量体化V領域断片(diabody)、ジスルフィド安定化抗体(disulfide stabilized Fv; 以下、dsFvと称す)およびCDRを含むペプチドを含有する。

Fabは、IgGのヒンジ領域で2本のH鎖を架橋している2つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パパインで分解して得られた、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体で構成された、分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

$F(ab')_2$ は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

Fab'は、上記 $F(ab')_2$ のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

scFvは、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと称す）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドである。本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLは、抗FGF-8中和モノクローナル抗体であればいかなるものでもよい。

diabodyは、抗原結合特異性の同じまたは異なるscFvが2量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する2価の抗原結合活性または異なる抗原に対するそれぞれ特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法（Reiter Y. et al., Protein Eng., 7, 697-704, 1994）に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用されるdsFvに含まれるVHあるいはVLは、抗FGF-8中和モノクローナル抗体であればいかなるものでもよい。

本発明の関節炎の予防薬または治療薬で使用されるCDRを含むペプチドは、抗FGF-8中和抗体のVHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることにより製造することができる。

以下に、本発明で使用される抗FGF-8中和抗体の具体的な作製方法と活性評価方法、該抗体を含有する関節炎の予防薬または治療薬、抗FGF-8抗体を含有する関節

炎の診断薬、抗FGF-8抗体を用いた関節炎の判定方法について説明する。

1. 抗FGF-8中和抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）の作製方法

（1）抗原の調製

抗FGF-8中和抗体を作製するために必要な抗原としては、FGF-8を産生する細胞あるいはその細胞画分、またはFGF-8蛋白質、該蛋白質の部分断片、該蛋白質のアミノ酸配列の部分配列を有するペプチドなどがあげられる。

FGF-8蛋白質および該蛋白質の部分断片は、FGF-8をコードする全長あるいはその部分断片DNA (Tanaka A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8928-8932, 1992、Tanaka A. et al., FEBS Lett., 363, 226-230, 1996) を適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組み換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより得られたFGF-8発現細胞を、適当な培地中で培養することにより細胞内あるいは培養上清中にそのままあるいは融合蛋白質として生産することができる。また、FGF-8蛋白質の部分配列を有するペプチドは、ペプチド合成機を用いて調製することができる。

FGF-8をコードする全長あるいはその部分断片DNAは、FGF-8を発現しているSC-3等の細胞から調製したcDNAを鋳型にした、ポリメラーゼ連鎖反応〔Polymerase Chain Reaction、以下PCRと記す；Sambrook J. et al., Molecular Cloning 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001（以下、「モレキュラー・クローニング 第3版」と記す）、Ausubel F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-2001（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと記す）〕により調製することができる。

宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli)、バチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis) 等のエシェリヒア属、バチルス属等の細菌が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) 等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Sf9、Sf21〔フ

アーミンジェン (Farming)社製]、High Five [インビトロジェン (Invitrogen) 社製] 等が例示される。

FGF-8をコードする全長あるいはその部分断片DNAを導入するベクターとしては、該DNAを組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。

細菌、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、プロモーター、リボゾーム結合配列、FGF-8をコードする全長あるいはその部分断片DNA、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましいが、例えば、市販のpGEX-2T [アマシヤム・バイオサイエンス (Amersham Biosciences) 社製]、pET17b [ノバジェン (Novagen) 社製] などが例示される。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 (Cohen S. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110-2114, 1972)、プロトプラスト法 (特開昭63-248394) 等、いずれの方法も用いられる。

酵母を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等が用いられる。

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 (Becker D. M. and Guarente L., Methods. Enzymol., 194, 182-187, 1991)、スフェロプラスト法 (Hinnen A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929-1933, 1978)、酢酸リチウム法 (Ito H. et al., J. Bacteriol., 153, 163-168, 1983) 等、いずれの方法も用いられる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE107 (特開平3-22979; Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140, 1990)、pAGE103 (Mizukami T. and Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310, 1987) 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウィルス (CMV) のIE(immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげ

られる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 (Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140, 1990)、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 (Felgner P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417, 1987) 等、いずれの方法も用いられる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、O' Reilly et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford University Press, 1994等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得たのち、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質発現昆虫細胞を取得する。

遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393 (共にファーマンジェン社製)、pBlueBac4.5 (インビトロジェン社製) 等が用いられる。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヤガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) などが用いられる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 (Felgner P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417, 1987) 等が用いられる。

また、ファーマンジェン社製バキュロゴールドスターターキットなどを用いて組み換えバキュロウイルスを作製したのち、前述したSf9、Sf21あるいはHigh Five等の昆虫細胞に該組み換えウイルスを感染させることにより蛋白質を生産させることもできる (Bio/Technology, 6, 47, 1988)。

遺伝子の発現方法としては、FGF-8蛋白質だけを細胞内に発現させる以外に、分泌生産、融合蛋白質発現等が開発されており、いずれの方法も用いることができる。例えば、モレキュラー・クローニング 第3版に記載されている方法に準じ

て行うことができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中にFGF-8蛋白質を生成蓄積させ、該培養物からFGF-8蛋白質を採取することにより、FGF-8蛋白質の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として製造することができる。

形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい（モレキュラー・クローニング 第3版）。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下、15～40℃で16～96時間行う。培養期間中、pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。培養中は必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、イーグル（Eagle）のMEM培地またはこれら培地にウシ胎児血清（以下、FBSと略す）等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常5%CO₂存在下、35～37℃で3～7日間行い、培養中は必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地（ファーミンジェン社製）、Sf900IISFM（インビトロジェン社製）、EX-CELL400、EX-CELL405〔いずれもJRHバイオサイエンス（JRH Biosciences）社製〕等が用いられる。培養は、25～30℃で1～4日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記において、動物細胞および昆虫細胞の培養において可能であれば、FGF-8の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質の精製を容易にするため、血清無添加の培地を用いることが好ましい。

FGF-8の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として宿主細胞内に蓄積された場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん濁後

、超音波法、フレンチプレス法などにより細胞を破碎し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、タンパク質の立体構造を形成させることができる。

FGF-8蛋白質の全長または部分断片、あるいはこれらの蛋白質の融合蛋白質が細胞外に分泌された場合には、培養上清中に発現蛋白質を回収することができる。

単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。

FGF-8のアミノ酸配列の部分配列を有するペプチドは、Fmoc（フルオレニルメチルオキシカルボニル）法、tBoc（t-ブチルオキシカルボニル）法等の化学合成法によって製造することができる。また、アドバンスド・ケムテック（Advanced ChemTech）社、アプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems）社、プロテイン・テクノロジーズ（Protein Technologies）社、島津製作所等のペプチド合成機を用いても製造することができる。

（２）動物の免疫と抗体産生細胞の調製

上記で得られた該蛋白質を抗原として動物を免疫する。免疫する方法としては、動物の皮下、静脈内または腹腔内に抗原をそのまま投与してもよいが、抗原性の高いキャリアタンパク質を抗原に結合させて投与する、あるいは適当なアジュバントとともに抗原を投与することが好ましい。

キャリアタンパク質としては、キーホール・リンベット・ヘモシアニン（Keyhole limpet hemocyanin）、ウシ血清アルブミン、ウシチログロブリン等があげられ、アジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント（Complete Freund's Adjuvant）、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチン等があげられる。

免疫動物としては、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスターなどの非ヒト

哺乳動物があげられる。

抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間毎に3～10回行う。抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。各投与後、3～7日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、該血清の抗原との特異的な結合性について、下記に示すような酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法 第3版 医学書院 1987年、アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル (Chapter 14)、Goding J. W., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1996 (以下、モノクローナル・アンチボディーズと略す)〕などで確認する。

酵素免疫測定法は以下のようにして行うことができる。

抗原蛋白質あるいは抗原蛋白質を発現した細胞などをプレートにコートし免疫動物より採取した血清を第一抗体として反応させる。第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。反応後、第二抗体を標識した物質に応じた検出反応を行い、抗体価を測定する。

第二抗体とは、第一抗体を認識できる抗体を、パーオキシダーゼ等の酵素やビオチン等で標識したものである。具体的には、免疫動物にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

そして、該血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物を、抗体産生細胞の供給源とする。

抗原の最終投与後3～7日目に、免疫動物より公知の方法（アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル）に準じてリンパ球を摘出し、リンパ球と骨髓腫細胞とを融合させる。

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。該ポリクローナル抗体がFGF-8の活性を阻害する中和活性を有しているかどうかは下記の1. (4)に記載の細胞増殖阻害アッセイで調べることができる。

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒト哺乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該細胞を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

抗体産生細胞は、抗原投与された非ヒト哺乳動物脾細胞、リンパ節、末梢血な

どから採取する。

(3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1 (Kohler G and Milstein C, Eur. J. Immunol., 6, 511-519, 1976)、SP2/0-Ag14 (Shulman M. et al., Nature, 276, 269-270, 1978)、P3-X63-Ag8653 (Kearney J. F. et al., J. Immunol., 123, 1548-1550, 1979)、P3-X63-Ag8 (Kohler G and Milstein C, Nature, 256, 495-497, 1975) など、イン・ビトロ (in vitro) で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法 (アンチボディース・ア・ラボラトリー・マニュアル) に従い、細胞融合時までに 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

(4) 細胞融合とモノクローナル抗体の選択

上記で得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄にはMEM培地またはPBS ($1.83\text{g/L Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $0.21\text{g/L KH}_2\text{PO}_4$ 、 7.65g/L NaCl 、 $\text{pH}7.2$) などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT培地〔正常培地 (1.5mmol/L グルタミン、 $50\mu\text{mol/L}$ 2-メルカプトエタノール、 10g/mL ゲンタマイシンおよび10% FBSを加えたRPMI 1640培地) に $100\mu\text{mol/L}$ ヒポキサンチン、 $15\mu\text{mol/L}$ チミジンおよび $0.4\mu\text{mol/L}$ アミノプテリンを加えた培地〕を用いる。

培養後、培養上清の一部をとり、下記の酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをFGF-8と特異的に結合するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

酵素免疫測定法は1. (2) に記載したのと同様に行うが、第一抗体として、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の方法で得られる精製抗体を用いる。

モノクローナル抗体とFGF-8との特異的な結合は表面プラズモン共鳴 (Karlsson R. et al., J. Immunol. Methods, 145, 229-240, 1991) によっても評価できる。

抗FGF-8モノクローナル抗体の具体例としては、特開平9-271391に記載されているマウスIgG1サブクラスに属するハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451) が生産するモノクローナル抗体KM1334があげられる。

上記で選択されたハイブリドーマが生産する抗FGF-8モノクローナル抗体がFGF-8の活性を阻害できるか否かを、ターゲット細胞にマウス乳癌細胞株SC-3 (Nakamura N. et al., J Steroid Biochem., 27, 459-464, 1987)、マウス線維芽細胞株NIH/3T3 (ATCC番号: CRL-1658)、もしくはヒト前立腺癌細胞株LNCaP (ATCC番号: CRL-1740) を用いた増殖阻害アッセイにて調べる。方法としては、ターゲット細胞をFGF-8 (1~100ng/mL) あるいはテストステロンを含む培地にて培養する際、培養上清もしくは下記2. (5) にしたがって精製した抗FGF-8モノクローナル抗体の最終濃度が0.001~100 μ g/mLになるように段階希釈して培地中に添加する。24~72時間培養後、MTT [3-(4,5-ジメチル-2-チアゾル-2-イル) -2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロマイド] 溶液、セルカウンティングキットもしくはWST-1キットなどを用いて生細胞数を測定する。抗FGF-8モノクローナル抗体を添加しない場合に比べて抗FGF-8モノクローナル抗体の濃度依存的に生細胞数が減少する場合に、該抗FGF-8モノクローナル抗体はFGF-8の活性を阻害する抗FGF-8中和抗体であることが確認できる。

また、ボルトン-ハンター法 (Bolton A. E. and Hunter W. M., Biochem. J., 133, 529-539, 1973) など¹²⁵I 標識したFGF-8の上記の細胞株への結合測定系を用いて、抗FGF-8モノクローナル抗体のFGF-8の細胞表面上の受容体への結合阻害活性を測定することができる。

上記のモノクローナル抗体KM1334は、FGF-8の活性を阻害する活性を有する抗FGF-8中和抗体であり、関節炎の予防薬または治療薬として好ましい。

(5) モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を培養して得られる培養液、またはプリスタン (Pristane、2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン) 0.5mLを腹腔内投与し、2週間飼育する] した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を腹腔内投与して腹水癌化させた腹水から、分離、精製することにより調製できる。

モノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和

硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて行う方法があげられる。この方法により、IgGあるいはIgM画分を回収し、精製モノクローナル抗体を取得することができる。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、モノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4があげられるが、特にマウスIgG1、IgG2a、ヒトIgG1タイプは、補体依存性細胞傷害活性および抗体依存性細胞傷害活性を有し、治療への応用上、有用である。

2. 抗FGF-8中和ヒト化抗体の作製方法

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト以外の動物の抗体からヒト化抗体を作製するために必要なヒト化抗体発現用ベクターを構築する。ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のC領域であるCHおよびCLをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子をそれぞれ挿入することにより構築することができる。

ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のCHおよびCLであることができ、例えば、ヒト抗体 γ 1サブクラスのCH、 γ 4サブクラスのCH、および κ クラスのCL等があげられる。ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAとしてはエキソンとイントロンより成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体C領域をコードする遺伝子を組み込み、発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。

例えば、pAGE107 (特開平3-22979; Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140, 1990)、pAGE103 (Mizukami T. and Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310, 1987)、pHSG274 (Brady G. et al., Gene, 27, 223-232, 1984)、pKCR (O'Hare K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78, 1527-1531, 1981)、pSG1 β d2-4 (Miyaji H. et al., Cytotechnology, 4, 173-180, 1990) 等が

あげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー (Mizukami T. and Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310, 1987)、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTRプロモーターとエンハンサー (Kuwana Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960-968, 1987)、および免疫グロブリンH鎖のプロモーター (Mason J. O. et al., Cell, 41, 479-487, 1985) とエンハンサー (Gillies S. D. et al., Cell, 33, 717-728, 1983) 等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖、L鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ (タンデム型) のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のし易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスがとれる等の点でタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい (Shitara K. et al., J. Immunol. Methods, 167, 271-278, 1994)。タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 (W097/10354)、pEE18 (Bentley K. J. et al., Hybridoma, 17, 559-567, 1998) などがあげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

(2) ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLをコードするDNAの取得

ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体、例えば、マウス抗FGF-8中和モノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするDNAは以下のようにして取得する。

マウス抗FGF-8中和モノクローナル抗体を産生する細胞、例えば、マウスFGF-8中和抗体産生ハイブリドーマ等よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAを、ファージあるいはプラスミドなどのベクターに挿入し、cDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体のC領域部分あるいはV領域部分をプローブとして用い、VHをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、およびVLをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。

組換えファージあるいは組換えプラスミド上のVHおよびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリ

ドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。ハイブリドーマから全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 (Okayama H. et al., *Methods Enzymol.*, 154, 3-28, 1987)、また、全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング 第3版) などがあげられる。また、ハイブリドーマからmRNAを調製するキットとしては、ファストトラック (FastTrack) mRNA単離キット (インビトロジェン社製)、クイックブレップ (QuickPrep) mRNA精製キット (アマシャム・バイオサイエンシズ社製) などがあげられる。

cDNAの合成およびcDNAライブラリー作製法としては、常法 (モレキュラー・クローニング 第3版; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー)、あるいは市販のキット、例えば、cDNA合成用スーパースクリプト・チヨイス・システム (SuperScript Choice System for cDNA Synthesis、インビトロジェン社製) やZAP-cDNA合成キット [ストラタジーン (STRATAGENE) 社製]、タイムセーバー (TimeSaver) cDNA合成キット (アマシャム・バイオサイエンシズ社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマから抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express (ストラタジーン社製)、pBluescript II SK(+) (ストラタジーン社製)、 λ ZAP II (ストラタジーン社製)、 λ gt10 (ストラタジーン社製)、 λ gt11 (ストラタジーン社製)、Lambda BlueMid (Clontech社製)、 λ ExCell (アマシャム・バイオサイエンシズ社製)、pcD2 (Okayama H. and Berg P., *Mol. Cell. Biol.*, 3, 280-289, 1983) および pUC18 (Yanisch-Perron C. et al., *Gene*, 33, 103-119, 1985) などのファージあるいはプラスミドベクターが用いられる。

ファージあるいはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' (ストラタジーン社製)、C600 (Appleyard R. K. *Genetics*, 39, 440-452, 1954)、Y1088 (Young R. A. and Davis R., *Science*, 222, 778-782, 1983)、Y1090 (Young

R. A. and Davis R., Science, 222, 778-782, 1983)、NM522 (Gough J. A. and Murray N. E., J. Mol. Biol., 166, 1-19, 1983)、K802 (Wood W. B., J. Mol. Biol., 16, 118-133, 1966) およびJM105 (Yanisch-Perron C. et al., Gene, 33, 103-119, 1985) などが用いられる。

cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLをコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブランク・ハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング 第3版) により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、PCRによりVHおよびVLをコードするcDNAを調製することもできる。

上記方法により選択されたcDNAの塩基配列は、適当なベクターにクローニングされた該cDNAを用いてジデオキシ法 (Sanger F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, 1977) に基く反応を行い、ABI377 (アプライドバイオシステムズ社製) 等のDNAシーケンサーを用いて解析することで決定することができる。

(3) ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の解析とCDRのアミノ酸配列の同定

2. (2) で取得し、決定したcDNAの塩基配列から該cDNAがコードするVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991、以下、「シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト」と記す。) と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列 (シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト) と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびN末端アミノ酸配列を推定でき、さらにはそれらが属するサブグループを知ることができる。

さらに、任意のデータベース、例えばSWISS-PROTやPIR-Protein等に対して、

BLAST (Altschul S. F. et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) など相同性検索プログラムを用いて、得られたVHおよびVLの完全なアミノ酸配列の相同性検索を行い、配列の新規性を検討することができる。

抗体の抗原結合部位を形成するVH及びVLは、配列の比較的保存された4個のFRとそれらを連結する配列の変化に富んだ3個のCDR (CDR1、CDR2、CDR3) から成っている (シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)。そしてVHおよびVLの各CDRのアミノ酸配列は、既知の抗体のV領域のアミノ酸配列 (シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト) と比較することにより同定することができる。

(4) 抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターの構築

2. (1) で構築したヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLをコードするDNAを挿入し、抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLをコードするDNAを有するプラスミドを鋳型として、抗体のVHおよびVLを、適当な制限酵素の認識配列とV領域をコードする塩基配列よりなる5'末端側と3'末端側のプライマーを用いてPCR法により増幅し、それぞれの増幅産物をpBluescript II SK(-) (ストラタジーン社製) などのプラスミドにクローニングし、2. (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。得られたプラスミドより、抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNAを単離し、2. (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングし、抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

(5) 抗FGF-8中和CDR移植抗体のV領域をコードするDNAの構築

抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするDNAは、以下の様にして構築することができる。まず、ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどの

データベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）などがあげられるが、それらの中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、ヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性、好ましくは60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗FGF-8中和抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）を考慮して塩基配列に変換し、抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計する。設計した塩基配列に基づき、100～150塩基の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率および合成可能なDNAの長さから、VH、VLとも4本の合成DNAを設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、2.（1）で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR反応後、増幅産物をpBluescript SK(-)（ストラタジーン社製）などのプラスミドベクターにクローニングし、2.（2）に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望の抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミドを取得する。

（6）抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよびVLのFRに、移植しただけでは、その抗原結合活性はもとのヒト以外の動物の抗体の活性に比べて低下してしまうことが知られている（Tempest P. R. et al., Bio/technology, 9, 266-271, 1991）。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLでは、CDRのみならず、FRのいくつかのアミノ酸残基が直接的あるいは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基がCDRの移植に伴い、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの異なるアミノ酸残基へと変

化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型CDR移植抗体では、ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基やCDRのアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている (Tempest P. R. et al., Bio/technology, 9, 266-271, 1991)。ヒト型CDR移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにX線結晶解析 (Bernstein F. C. et al., J. Mol. Biol., 112, 535-542, 1977) あるいはコンピューターモデリング (Tempest P. R. et al., Protein Engineering, 7, 1501-1507, 1994) などによる抗体の立体構造の構築および解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型CDR移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型CDR移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討するなどの種々の試行錯誤が必要である。

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸残基の改変は、改変用合成DNAをプライマーとして用いてPCR法を行うことにより、達成できる。PCR後の増幅産物について2. (2) に記載の方法により、その塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認して、目的の変異が導入されたDNAを含むベクター (以下、アミノ酸配列改変ベクターと称す) を取得する。

また、狭い領域のアミノ酸配列の改変であれば、20~35塩基からなる変異導入プライマーを用いたPCR変異導入法により行うことができる。具体的には、改変後のアミノ酸残基をコードするDNA配列を含む20~35塩基からなるセンス変異プライマー及びアンチセンス変異プライマーを合成し、改変すべきVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNAを含むプラスミドを鋳型として2段階のPCRを行う。最終増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたDNAを含むアミノ酸配列改変ベクターを取得する。

(7) 抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターの構築

2. (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコー

ドするDNAの上流に、2. (5) および (6) で構築した抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするDNAを挿入し、抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、2. (5) および (6) で抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、2. (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAの上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングすることができる。

(8) ヒト化抗体の一過性発現および活性評価

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、2.

(4) 記載の抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクター、2. (7) に記載の抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクター、あるいはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト化抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、COS-7細胞(ATCC番号: CRL-1651)が一般に用いられる(Warr G. W. et al., Methods in Nucleic Acids Research, CRC Press, 283, 1990)。COS-7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法(Warr G. W. et al., Methods in Nucleic Acids Research, CRC press, 283, 1990)、リポフェクション法(Felgner P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417, 1987)などがあげられる。

発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は、第一抗体として培養上清を、第二抗体として標識した抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いた1. (2) に記載の酵素免疫測定法などにより測定できる。また、FGF-8の活性を阻害する中和活性を保持しているかどうかを1. (4) に記載の細胞増殖阻害アッセイで確認することができる。

(9) ヒト化抗体の安定発現および活性評価

2. (4) 記載の抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターまたは2. (7) に記載の抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法(特開平2-257891; Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140, 1990)等がある。

げられる。

抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターまたは抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスSP2/0-Ag14細胞(ATCC番号:CRL-1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC番号:CRL-1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、DHFRと略す)遺伝子が欠損したCHO細胞であるCHO/DG44細胞(Urlaub G. and Chasin L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 1980)、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC番号:CRL-1662、以下、YB2/0細胞と称す)等があげられる。

発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換体は、G418 (G418 sulfate ; シグマ・アルドリッチ社製) などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる(Shitara K. et al., J. Immunol. Methods, 167, 271-278, 1994)。動物細胞培養用培地としては、RPMI 1640培地(日水製薬社製)、GIT培地(日本製薬社製)、EX-CELL302培地

(JRHバイオサイエンス社製)、IMDM培地(インビトロジェン社製)、ハイブリドマー-SFM培地(インビトロジェン社製)、またはこれら培地にFBSなどの各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換体を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は前記1.(4)に記載のELISAなどにより測定できる。また、形質転換体は、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる(Shitara K. et al., J. Immunol. Methods, 167, 271-278, 1994)。

ヒト化抗体は、形質転換体の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる(アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル, chapter 8; モノクローナル・アンチボディーズ)。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組合せて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE ; laemmli U. K., Nature, 227, 680-685, 1970) やウエスタンブロッティング法(アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル,

chapter 12; モノクローナル・アンチボディーズ) 等で測定する。

精製したヒト化抗体の抗原結合活性は、第一抗体として精製ヒト化抗体を、第二抗体として標識した抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いた前記1. (2) に記載の酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴 (Karlsson R. et al., J. Immunol. Methods, 145, 229-240, 1991) などにより測定できる。また、FGF-8の活性を阻害する中和活性を保持しているかどうかを1. (4) に記載の細胞増殖阻害アッセイで確認することができる。

3. 抗体断片の作製

抗体断片は、1. および2. に記載の抗FGF-8中和モノクローナル抗体、抗FGF-8中和ヒト化抗体を元に遺伝子工学的的手法あるいは蛋白質化学的手法により、作製することができる。抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、diabody、dsFv、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

(1) Fabの作製

Fabは、抗FGF-8中和抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理することにより、作製することができる。パパインの処理後は、元の抗体がプロテインA結合性を有するIgGサブクラスであれば、プロテインAカラムに通すことで、IgG分子やFc断片と分離し、均一なFabとして回収することができる (モノクローナル・アンチボディーズ)。プロテインA結合性を持たないIgGサブクラスの抗体の場合は、イオン交換クロマトグラフィーにより、Fabは低塩濃度で溶出される画分中に回収することができる (モノクローナル・アンチボディーズ)。また、Fabは、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することもできる。例えば、2. (2)、(5) および(6) に記載の抗体のV領域をコードするDNAを、Fab発現用ベクターにクローニングし、Fab発現ベクターを作製することができる。Fab発現用ベクターとしては、Fab用のDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pIT106 (Better M. et al., Science, 240, 1041-1043, 1988) などがあげられる。Fab発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にFabを生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるFabとすることができ、また、ペリプラズマに発現させた場合は、培養上清中に活性を持ったFabが漏出する。リフォールディング後あるいは培養上清からは、抗原を結合させたカラムを用いる

ことにより、均一なFabを精製することができる (Borrebeck K., Antibody Engineering: A Practical Guide, Oxford University Press, 1991)。

(2) $F(ab')_2$ の作製

$F(ab')_2$ は、抗FGF-8中和抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理することにより、作製することができる。ペプシンの処理後は、Fabと同様の精製操作により、均一な $F(ab')_2$ として回収することができる (モノクローナル・アンチボディーズ)。また、3. (3) に記載のFab' をN,N'-o-フェニレンジマレイミドやビスマレイミドヘキサン等のようなマレイミドで処理し、チオエーテル結合させる方法や、5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) で処理し、ジスルフィド結合させる方法によっても作製することができる (McCafferty J. et al., Antibody Engineering: A Practical Approach, IRL Press, 1996)。

(3) Fab'の作製

Fab' は、3. (2) に記載の $F(ab')_2$ をジチオスレイトール等の還元剤で処理して得ることができる。また、Fab' は、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することもできる。例えば、2. (2)、(5) および (6) に記載の抗体のV領域をコードするDNAを、Fab' 発現用ベクターにクローニングし、Fab' 発現ベクターを作製することができる。Fab' 発現用ベクターとしては、2. (2)、(5) および (6) に記載の抗体のV領域をコードするDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pAK19 (Carter P. et al., Bio/technology, 10, 163-167, 1992) などがあげられる。Fab' 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にFab' を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるFab' とすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破碎し、菌体外へ回収させることができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、プロテインGカラム等を用いることにより、均一なFab' を精製することができる (McCafferty J. et al., Antibody Engineering: A Practical Approach, IRL Press, 1996)。

(4) scFvの作製

scFvは遺伝子工学的には、ファージまたは大腸菌を用いて作製することができ

る。例えば、2. (2)、(5) および (6) に記載の抗体のVHおよびVLをコードするDNAを、12残基以上のアミノ酸配列からなるポリペプチドリンカーをコードするDNAを介して連結し、scFvをコードするDNAを作製する。ポリペプチドリンカーは、その付加がVH、VLの抗原への結合に対して妨害しないように最適化することが重要で、例えばPantolianoらにより示されたもの (Pantoliano M. W. et al., *Biochemistry*, 30, 10117-10125, 1991) あるいはそれを改変したものを用いることができる。

作製したDNAをscFv発現用ベクターにクローニングし、scFv発現ベクターを作製することができる。scFv発現用ベクターとしては、scFvのDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。

例えば、pCANTAB5E (アマシャム・バイオサイエンシズ社製)、Phfa (Lah M. et al., *Hum. Antibodies Hybridomas*, 5, 48-56, 1994) などがあげられる。scFv発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、ヘルパーファージを感染させることで、ファージ表面にscFvがファージ表面蛋白質と融合した形で発現するファージを得ることができる。また、scFv発現ベクターを導入した大腸菌の封入体あるいはペリプラズマ層にscFvを生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるscFvとすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破碎し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、陽イオン交換クロマトグラフィー等を用いることにより、均一なscFvを精製することができる (McCafferty J. et al., *Antibody Engineering: A Practical Approach*, IRL Press, 1996)。

(5) diabodyの作製

diabodyは、上記のscFvを作製する際のポリペプチドリンカーを3～10残基程度にすることで、作製することができる。1種類の抗体のVHおよびVLを用いた場合には、2価のdiabodyを、2種類の抗体のVHおよびVLを用いた場合は、2特異性を有するdiabodyを作製することができる

(Le Gall F. et al., *FEBS Lett.*, 453, 164-168, 1999、Courage C. et al., *Int. J. Cancer*, 77, 763-768, 1998)。

(6) dsFvの作製

dsFvは、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することもできる。まず、2. (2)、(5) および (6) に記載の抗体のVHおよびVLをコードするDNAの適当な位置に変異を導入し、コードするアミノ酸残基がシステインに置換されたDNAを作製する。アミノ酸残基のシステイン残基への改変は2. (6) のPCRを用いた変異導入法により行うことができる。作製した各DNAをdsFv発現用ベクターにクローニングし、VHおよびVLの発現ベクターを作製することができる。dsFv発現用ベクターとしては、dsFv用のDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pUL19 (Reiter Y. et al., Protein Eng., 7, 697-704, 1994) などがあげられる。VHおよびVLの発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にVHおよびVLを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層からVHおよびVLを得、混合し、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、ジスルフィド結合を形成させ、活性のあるdsFvとすることができる。リフォールディング後は、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、さらに精製することができる (Reiter Y. et al., Protein Eng., 7, 697-704, 1994)。

(7) CDRを含むペプチドの作製

CDRを含むペプチドは、Fmoc法あるいはtBoc法等の化学合成法によって作製することができる。また、CDRを含むペプチドをコードするDNAを作製し、作製したDNAを適当な発現用ベクターにクローニングし、CDRペプチド発現ベクターを作製することができる。発現用ベクターとしては、CDRを含むペプチドをコードするDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pLEX (インビトロジェン社製)、pAX4a+ [モビテック (MoBiTec) 社製] などがあげられる。発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にCDRを含むペプチドを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層からCDRを含むペプチドを得、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、精製することができる (Reiter Y. et al., Protein Eng., 7, 697-704, 1994)。

(8) 活性の評価

上記の抗体断片の抗原結合活性は抗体断片を第一抗体として用いた前記1. (

2) に記載の酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴 (Karlsson R. et al., J. Immunol. Methods, 145, 229-240, 1991) などにより測定できる。また、FGF-8の活性を阻害する中和活性を保持しているかどうかを 1. (4) に記載の細胞増殖阻害アッセイで確認することができる。

4. 本発明の予防薬および治療薬

抗FGF-8中和抗体は、滑膜や軟骨の細胞および組織上のFGF-8と結合し、FGF-8により誘導される軟骨の細胞外マトリックスの分解を抑制し、軟骨の破壊を抑制する能力を有するため、軟骨保護剤となる。また、該抗体はFGF-8により誘導される滑膜細胞の増殖を抑制する能力を有するため、滑膜細胞の増殖抑制剤となる。関節の破壊は、軟骨の破壊や滑膜細胞の増殖を伴うので、該抗体は滑膜細胞の増殖および軟骨の破壊を抑制することにより関節の破壊の抑制剤となる。関節炎は関節の破壊を伴う疾患であるので、該抗体は関節の破壊を抑制することにより関節炎の治療薬および予防薬となる。関節炎としては変形性関節症や関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強直性関節炎、乾癬性関節炎、椎間板疾患、急性結晶性滑膜炎（痛風、偽痛風を含む）などがあげられる。

ヒト化抗体は、ヒト以外の動物のモノクローナル抗体と比較して、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内において高い効果を示し、かつ免疫原性が低く、その効果が長期に渡り持続することが期待されるので、予防薬および治療薬として好ましい。

抗FGF-8中和抗体を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内、関節内、および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体またはペプチド製剤の場合、望ましくは関節内および静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤

、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体またはペプチドそのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体またはペプチドを微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体またはペプチドおよび用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $20\text{mg}/\text{kg}$ である。

抗FGF-8中和抗体が軟骨の細胞外マトリックスの分解を抑制すること、および滑膜細胞の増殖を抑制することは、以下（１）および（２）に示すイン・ビトロでのアッセイ系を用いて確認できる。また、関節炎の治療薬および予防薬になることは、以下（３）に示す関節炎病態モデル動物に該抗体を投与し、その関節炎症状を軽減できるかどうかによっても評価できる。

(1) FGF-8による軟骨破壊に対する阻害活性

軟骨の破壊は、軟骨細胞や軟骨器官を用いた軟骨の細胞外マトリックスの分解、軟骨細胞および滑膜細胞からの破壊因子の産生の増加を指標としたアッセイにより、軟骨破壊の進展による軟骨下骨の破壊は、骨吸収量を指標としたアッセイによりそれぞれ評価できる。

(a) 軟骨の細胞外マトリックスの分解

軟骨破壊作用は、初代培養したウサギ関節軟骨細胞を、FGF-8存在下で抗FGF-8中和抗体を添加した場合と添加しない場合で培養し、培養後にプレートに残存する細胞外マトリックスの量を測定することにより評価できる。細胞外マトリックスの量はパパイン処理により遊離してきたグリコサミノグリカンの量として測定する。FGF-8により誘導される細胞外マトリックスの減少が、抗FGF-8中和抗体の添加により阻害される場合、該抗体は軟骨破壊の抑制作用を有すると考えられる。

軟骨破壊作用は、Priceらの方法 (Price J. S. et al., *Arthritis Rheum.*, 42, 137-147, 1999) に従って初代培養したウシ鼻中隔軟骨器官を、FGF-8存在下で抗FGF-8中和抗体を添加した場合と添加しない場合で培養し、培養し、培養後の軟骨器官中の細胞外マトリックスの量を測定することによっても評価できる。FGF-8により誘導される細胞外マトリックスの減少が、抗FGF-8中和抗体の添加により阻害される場合、該抗体は軟骨破壊の抑制作用を有すると考えられる。細胞外マトリックスの量は、培養後の器官をパパイン処理し、遊離してきたグリコサミノグリカンの量を、ジメチルメチレンブルー法 (Chandrasekhar S. et al., *Anal. Biochem.* 161 103-108, 1987) にて測定するかまたは、コラーゲンの量を東京衛生年報, 36, 277, 1985に従いヒドロキシプロリン濃度として測定することにより測定できる。

(b) 軟骨破壊に関与する因子の産生

軟骨破壊に関与する因子としては、プロスタグランジンE₂、マトリックスメタロプロテイナーゼ-3、一酸化窒素をあげることができる。ウサギ関節軟骨細胞またはウサギ滑膜細胞をFGF-8存在下で抗FGF-8中和抗体を添加した場合と添加しない場合で培養し、これらの因子の該細胞からの産生量として、培養上清のプロスタグランジンE₂、マトリックスメタロプロテイナーゼ-3あるいは一酸化窒素

を測定する。FGF-8により促進されるプロスタグランジン E_2 、マトリックスメタロプロテイナーゼ-3あるいは一酸化窒素の産生が、抗FGF-8中和抗体の添加により阻害される場合、該抗体は軟骨破壊の抑制作用を有すると考えられる。

プロスタグランジン E_2 は、プロスタグランジン E_2 EIAシステム（アマシャム・バイオサイエンシズ社製）により、マトリックスメタロプロテイナーゼ-3は、ウサギマトリックスメタロプロテイナーゼ-3 ELISAシステム（アマシャム・バイオサイエンシズ社製）により、一酸化窒素はGriess試薬を用いる方法（Green L. C. et al., Anal. Biochem. 126, 131-138 1982）により測定することができる。

（c）骨吸収

骨吸収は、Kusanoらの方法（Kusano K., et al., Endocrinology, 139, 1338-1345, 1998）に従って、マウス頭蓋冠をFGF-8存在下で抗FGF-8中和抗体を添加した場合と添加しない場合で培養し、培養上清中のカルシウム濃度あるいはヒドロキシプロリン濃度を測定することにより評価できる。FGF-8により促進される骨吸収が、抗FGF-8中和抗体の添加により阻害される場合、該抗体は軟骨破壊の抑制作用を有すると考えられる。培養上清中のカルシウム濃度は、カルシウムC-テストワコー（和光純薬工業社製）を用いて測定できる。また培養上清中のヒドロキシプロリン濃度は、東京衛生年報，36，277，1985に従い測定できる。

（2）滑膜細胞の増殖抑制作用

滑膜細胞の増殖は、ヒトやウサギの滑膜細胞をFGF-8存在下で抗FGF-8中和抗体を添加した場合と添加しない場合で培養し、 $[^3H]$ チミジン取り込み量の測定により評価できる。FGF-8により促進される $[^3H]$ チミジン取り込み量が、抗FGF-8中和抗体の添加により阻害される場合、該抗体は滑膜細胞の増殖抑制作用を有すると考えられる。

（3）関節炎病態モデル動物を用いたイン・ビボでの評価

下記の関節炎病態モデル動物を用いて、FGF-8あるいは抗FGF-8中和抗体の関節破壊に対する効果を評価できる。関節炎病態モデル動物に抗FGF-8中和抗体を投与し、該モデル動物の関節炎の症状が軽減する場合に関節炎の治療薬や予防薬として用いることができると考えられる。

関節リウマチに類似した病態を示すモデル動物として、主として足関節に関節

炎が自然発症するMRL-lpr/lprマウス (Hang L. et al., J. Exp. Med., 155, 1690-1701, 1982、日本チャールス・リバーより購入可能)、結核死菌を免疫して誘導されるラット・アジュバント関節炎モデル (Pearson CM. et al., Arth. Rheum., 5, 654-658, 1962、Taurog J. D. et al., Cell. Immunol., 75, 271-282, 1983、Bendele A. et al., J. Rheumatol., 26, 1225-1229, 1999)、関節に多いII型コラーゲンをアジュバントとともに免疫して発症させるマウス・コラーゲン関節炎モデル (Stuart J. M. et al., Annu. Rev. Immunol., 2, 199-218, 1984、Kamada H. et al., Jpn. J. Pharmacol., 70, 169-175, 1996)などをあげることができる。これらのモデル動物は関節リウマチと類似した病態を示し、関節炎治療薬の評価に広く用いられている。

ラット・アジュバント関節炎モデルを用いる場合は、アジュバント処置足（急性炎症に続いて慢性炎症が起こる二相性の炎症反応が起こる）およびアジュバント非処置足（感作1週間頃から慢性炎症が起こる）それぞれについて、経時的に後肢足蹠浮腫容積を測定する。また左右後肢の軟X線撮影を行い、骨破壊および関節の変形について評価する。また、尿中のグリコサミノグリカン量を測定することにより、全身における軟骨破壊について、尿中のデオキシピリジノリン量またはヒドロキシプロリン量を測定することにより、全身における骨破壊について、それぞれ評価する。尿中のグリコサミノグリカン量は、ジメチルメチレンブルー法 (Chandrasekhar S. et al., Anal. Biochem. 161 103-108, 1987) により、尿中のデオキシピリジノリン量は、オステオリンクス「DPD」（住友製薬社製）を用いて、尿中のヒドロキシプロリン量は池田らの方法（池田眞悟ら，東京衛研年報. 36 277-282, 1985）に従って、それぞれ測定できる。さらに、全身の炎症反応の指標として血清中ムコ蛋白濃度をアスプローGP（大塚製薬）を用いて、血清中の一酸化窒素濃度を Tracey らの方法 (Tracey W. R., et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 272, 1011-1015, 1995) に従いそれぞれ測定する。

マウス・コラーゲン関節炎モデルを用いる場合は体重と全肢の関節炎スコアの経時変化、血清中抗コラーゲン抗体価を測定する。さらに解剖後、関節部の病理組織学的検討を行う。関節炎スコアは一肢0から4点、全肢最高16点のスコアリングによって評価する。スコアの基準は、0：正常、1：弱い紅斑を認める、2：弱い腫脹と紅斑を認める、3：強い腫脹と紅斑を認め、触知により温感を認め

る、4：手指の変形を伴う著明な腫脹を認めるとする。

変形性関節症モデルとして、イヌ、ウサギなどの大動物を用い膝半月の切除や靱帯の切離によって関節に動揺性を生ぜしめ、慢性的な関節の変性を発生させるモデル（以下、実験的変形性関節症モデルと称する）が多く用いられている（伊藤隆太，新薬開発のための動物モデル利用集成，変形性関節症，R&Dプランニング，1985年、Guingamp C. et al., Arthritis Rheum., 40, 1670-1679, 1997、van der Kraan P. M. et al., Am. J. Pathol., 135, 1001-1014, 1989）。また、ラットの膝関節内にモノヨード酢酸を注入することにより、関節軟骨の細胞外マトリックスであるグリコサミノグリカンの遊離を促進し、関節破壊を惹起するラット・モノヨード酢酸誘発変形性関節症モデルも変形性関節症モデルとしてあげられる。

ウサギ膝関節半月板部分切除による実験的変形性関節症モデルは、Colomboらの方法（Colombo C. et al., Arthritis Rheum., 26, 875-886, 1983）および菊地らの方法（菊地寿幸ら，関節外科，15, 92-98, 1966）により作製できる。

ラット・モノヨード酢酸誘発変形性関節症モデルは、Guigampらの方法（Guigamp C. et al., Arthritis Rheum., 40, 1670-1679, 1997）に基き、ラットの膝関節内にモノヨード酢酸を注入して作製できる。

これらの変形性関節症モデル動物は一定期間後に膝関節膝蓋骨を摘出し、パパイン処理し、グリコサミノグリカンの量をジメチルメチレンブルー法（Chandrasekhar S. et al., Anal. Biochem. 161, 103-108, 1987）にて測定することにより関節破壊（細胞外マトリックスの分解）を評価する。また、膝関節の病理組織学的検討を行う。

抗FGF-8中和抗体をモデル動物に投与する際の剤型および投与経路としては、対象となるモデル動物の性質や重篤度に応じて適宜選択することができる。

例えば、それらをそのまま、または他の薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、希釈剤等と共に、モデル動物に対して、経口的または非経口的（腹腔内、静脈内、関節内、筋肉内、皮下投与など）に投与することができる。

抗FGF-8中和抗体の配合量並びに投与量は、その製剤の投与方法、投与形態、使用目的、モデル動物の具体的症状、モデル動物の体重などに応じて個別に決定され、特に限定されないが、投与量として、1日当たり概ね1 μ g/kg～100mg/kg程度

を、投与間隔として1日1回程度でも可能であり、1日2～4回、またはそれ以上の回数に分けて投与することもできる。また、例えば点滴などにより連続的に投与することも可能である。関節などの局所に投与する場合には、1個所に概ね1pgから100mgを投与する。

5. 本発明の診断薬

FGF-8は関節における滑膜細胞の増殖、軟骨の細胞外マトリックスの破壊を誘導する。上述した抗FGF-8抗体は、FGF-8と特異的に結合し、FGF-8を検出および定量できるので、関節炎の診断薬として用いることができる。診断できる関節炎としては、上記4.に記載した疾患があげられる。FGF-8の検出および定量は、下記6.に示す方法により行うことができる。

本発明の診断薬に使用される抗FGF-8抗体としては、FGF-8に特異的に結合する抗体であればいかなるものでもよく、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれでもいずれも用いることができるが、モノクローナル抗体が好ましく用いられる。

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産される抗体、ヒト化抗体およびこれらの抗体の抗体断片をあげることができる。

本発明の診断薬で使用される、抗FGF-8抗体は、上記の抗FGF-8中和抗体の製造法と同様にして製造することができるが、FGF-8の活性を阻害することを要しない。抗FGF-8中和抗体を、本発明の診断薬として使用される抗FGF-8抗体として用いることもできる。本発明の診断薬に用いられる抗FGF-8抗体の具体例としては、ハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451) が生産するモノクローナル抗体KM1334、形質転換体KM3034 (FERM BP-7836) が生産するヒト型キメラ抗体KM3034、形質転換体KM3334が生産するヒト型キメラ抗体KM3334、形質転換体KM8037 (FERM BP-8084) が生産するヒト型CDR移植抗体HV0LV6、形質転換体KM8034が生産するヒト型CDR移植抗体HV0LV6/CHO、形質転換体KM8036 (FERM BP-8083) が生産するヒト型CDR移植抗体HV0LV3-1/CHOおよび形質転換体KM8035 (FERM BP-8082) が生産するヒト型CDR移植抗体HV0LV4-3/CHOがあげられる。

抗FGF-8抗体を含有する診断薬は、下記6.に示すような判定方法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、緩衝剤、塩等が挙げられる。検出用試薬とし

ては、抗FGF-8抗体を認識する標識された二次抗体、標識に対応した基質等の通常の免疫学的検出法に用いられる試薬があげられる。

6. 本発明の関節炎の判定方法

本発明の判定方法で判定される関節炎としては、上記4. に記載した疾患があげられる。これらの疾患の患者の関節では、健常者と比較して、滑膜細胞の増殖、軟骨の細胞外マトリックスの破壊を誘導する活性をもつFGF-8の量が増加していると考えられる。

本発明の関節炎の判定方法としては、例えば、バイオプシー等で被験者より採取した関節の滑膜や軟骨の細胞または組織切片、および該細胞または組織より調製した細胞抽出液、滑液等を用いて、細胞あるいは組織に存在するFGF-8を下記に述べるように、免疫学的に検出および／または定量する方法があげられる。

FGF-8に対する抗体を用いて関節に発現したFGF-8を免疫学的に検出および／または定量する方法としては、蛍光抗体法、酵素免疫測定法（ELISA）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法（富山朔二および安東民衛，単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック，1987年、日本生化学会，続生化学実験講座5，免疫生化学研究法，東京化学同人，1986年）などを用いることができる。

蛍光抗体法は、文献（モノクローナル・アンチボディーズ、富山朔二および安東民衛，単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック，1987年）等に記載された方法を用いて行うことができる。具体的には、分離した関節の細胞あるいは組織などに、抗FGF-8抗体を反応させ、さらにフルオレセイン・イソチオシアネート（FITC）あるいはフィコエリスリンなどの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

酵素免疫測定法（ELISA）は、分離した関節の細胞あるいは組織、滑液などに、抗FGF-8抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、酵素反応により発色する基質を加えて反応させ、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法（R I A）は、分離した分離した関節の細胞あるいは組織、滑液などに、抗FGF-8抗体を反応させ、さらに放射性同位体標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで放射能を測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法は、分離した関節の細胞あるいは組織などに、抗FGF-8抗体を反応させ、さらにF I T Cなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素等で標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させ、酵素標識の場合は酵素反応により発色する基質を加えて反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法であり、文献（モノクローナル・アンチボディーズ、富山朔二および安東民衛，単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンス・フィック，1987年）等に記載された方法を用いて行うことができる。

ウェスタンブロッティングは、分離した関節の細胞あるいは組織、それらの破碎液、滑液などをSDSを含むサンプル用緩衝液に溶解させてSDS-PAGEを行なったのち、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜に転写し、抗FGF-8抗体を反応させ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、酵素反応により発色あるいは化学発光する基質を加えて反応させ、バンドとして検出する方法である。

免疫沈降法は、分離した関節の細胞あるいは組織の破碎液、滑液とビーズ等に固定化した抗FGF-8抗体を反応させ、遠心等によりビーズを単離した後、ビーズをSDSを含むサンプル用緩衝液で処理して、溶解させたFGF-8をウェスタンブロッティング等により検出する方法である。

サンドイッチELISAはエピトープがそれぞれ異なる2種類の抗FGF-8抗体を用いた酵素免疫測定法の一つである。一方の抗FGF-8抗体をプレート上に固定し、分離した関節の細胞あるいは組織、それらの破碎液、滑液を反応させた後、プレート上の抗FGF-8抗体に結合したFGF-8にさらにもう一方の抗FGF-8抗体を反応させる。ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体を反応させた後、酵素反応により発色する基質を加えて反応させ、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

第1図 ウサギ軟骨細胞のFGF-8による細胞外マトリックスの分解作用を示す図である。縦軸は細胞外マトリックス中に残ったグリコサミノグリカンの量を、横軸はFGF-8の濃度 (ng/mL) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、***は $P < 0.001$ (無刺激群対比、Dunnett検定) を表す。

第2図 ウサギ軟骨細胞のFGF-8による細胞外マトリックスの分解に対する抗FGF-8中和抗体KM1334の阻害作用を示す図である。縦軸は細胞外マトリックス中に残ったグリコサミノグリカンの量を、横軸はKM1334の濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、###は $P < 0.001$ (無刺激群対比、Studentのt-検定) を表し、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ (0群対比、Dunnett検定) を表す。

第3図 ウサギ軟骨細胞のFGF-8によるマトリックスメタロプロテイナーゼ-3産生の促進と抗FGF-8中和抗体KM1334による阻害作用を示す図である。縦軸は培養液中のマトリックスメタロプロテイナーゼ-3の量 (ng/ウェル) を、横軸はKM1334の濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、##は $P < 0.01$ (無刺激群対比、Aspin-Welch検定) を表し、***は $P < 0.001$ (0群対比、Dunnett検定) を表す。

第4図 ウサギ滑膜細胞のFGF-8による増殖の促進作用を示す図である。縦軸はウサギ滑膜細胞に取り込まれた $[^3\text{H}]$ チミジンの放射活性を、横軸はFGF-8の濃度 (ng/mL) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、*は $P < 0.05$ (無刺激群対比、Steel検定) を表す。

第5図 ウサギ滑膜細胞のFGF-8による増殖の促進に対する抗FGF-8中和抗体KM1334の阻害作用を示す図である。縦軸はウサギ滑膜細胞に取り込まれた $[^3\text{H}]$ チミジンの放射活性を、横軸はKM1334の濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、###は $P < 0.001$ (無刺激群対比、Studentのt-検定) を表し、***は $P < 0.001$ (0群対比、Dunnett検定) を表す。

第6図 ヒト滑膜細胞のFGF-8による増殖の促進作用を示す図である。縦軸はヒト滑膜細胞に取り込まれた $[^3\text{H}]$ チミジンの放射活性を、横軸はFGF-8の濃度 (ng/mL) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、***は $P < 0.001$ (無刺激群対比、Dunnett検定) を表す。

第7図 ヒト滑膜細胞のFGF-8による増殖の促進に対する抗FGF-8中和抗体KM1334の阻害作用を示す図である。縦軸はヒト滑膜細胞に取り込まれた $[^3\text{H}]$ チミジンの

放射活性を、横軸はKM1334の濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、###は $P<0.001$ (無刺激群対比、Aspin-Welch検定) を表し、*は $P<0.05$ (0群対比、Steel検定) を表す。

第8図 FGF-8 の注入による関節の細胞外マトリックスの分解を示す図である。縦軸は関節洗浄液中のグリコサミノグリカン濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、**は $P<0.01$ (生理食塩液注入群対比、Student の t-検定) を表す。

第9図 FGF-8 の注入による関節の膝蓋骨の破壊を示す図である。縦軸は膝蓋骨重量 (mg) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、*は $P<0.05$ (生理食塩液注入群対比、Student の t-検定) を表す。

第10図 コラーゲン関節炎発症マウスにおける関節炎スコアの経時変化に対する抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 の阻害作用を示す図である。縦軸は関節炎スコアを、横軸はコラーゲン初回感作日からの経過日数を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、*は $P<0.05$ (生理食塩液投与群対比、Wilcoxon 順位和検定) を表し、#は $P<0.05$ (溶媒投与群対比、Wilcoxon 順位和検定) を表す。

第11図 アジュバント関節炎発症ラットにおけるアジュバント非処置足の足容積増加に対する抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 の阻害作用を示す図である。縦軸は足容積 (mL) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、###は $P<0.001$ (未処置群対比、Aspin-Welch 検定) を表し、**は $P<0.01$ (生理食塩液投与群対比、Student の t-検定) を表す。

第12図 アジュバント関節炎発症ラットにおけるアジュバント非処置足の足容積増加に対するジクロフェナックナトリウム、メソトレキセート、およびプレドニゾロンの阻害作用を示す図である。縦軸は足容積 (mL) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、###は $P<0.001$ (未処置群対比、Aspin-Welch 検定) を表し、***は $P<0.001$ (溶媒投与群対比、Student の t-検定) を表し、††は $P<0.01$ 、†††は $P<0.001$ (溶媒投与群対比、Aspin-Welch 検定) を表す。

第13図 アジュバント関節炎発症ラット尿中のグルコサミノグリカン量上昇に対する抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 の阻害作用を示す図である。縦軸はグルコサミノグリカン濃度/クレアチニン濃度比 ($\mu\text{g/mg}$) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、###は $P<0.001$ (未処置群対比、Aspin-Welch 検定) を表し、

**は $P < 0.01$ (生理食塩液投与群対比、Student の t-検定) を表す。

第 14 図 アジュバント関節炎発症ラット尿中のグルコサミノグリカン量上昇に対するジクロフェナックナトリウム、メソトレキセート、およびプレドニゾロンの阻害作用を示す図である。縦軸はグルコサミノグリカン濃度／クレアチニン濃度比 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、##は $P < 0.01$ (未処置群対比、Aspin-Welch 検定) を表し、*は $P < 0.05$ (溶媒投与群対比、Student の t-検定) を表す。

第 15 図 アジュバント関節炎発症ラット尿中のデオキシビリジノリン量上昇に対する抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 の阻害作用を示す図である。縦軸はデオキシビリジノリン濃度／クレアチニン濃度比 (nmol/mmol) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、###は $P < 0.001$ (未処置群対比、Aspin-Welch 検定) を表し、*は $P < 0.05$ (生理食塩液投与群対比、Student の t-検定) を表す。

第 16 図 アジュバント関節炎発症ラット尿中のデオキシビリジノリン量上昇に対するジクロフェナックナトリウム、メソトレキセート、およびプレドニゾロンの阻害作用を示す図である。縦軸はデオキシビリジノリン濃度／クレアチニン濃度比 (nmol/mmol) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、###は $P < 0.001$ (未処置群対比、Student の t-検定) を表し、**は $P < 0.01$ (溶媒投与群対比、Student の t-検定) を表す。

第 17 図 アジュバント関節炎発症ラット尿中のヒドロキシプロリン量上昇に対する抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 の阻害作用を示す図である。縦軸はヒドロキシプロリン濃度／クレアチニン濃度比 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、###は $P < 0.001$ (未処置群対比、Student の t-検定) を表す。

第 18 図 モノヨード酢酸誘発変形性関節症モデルラットにおける関節軟骨破壊に対する抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 の阻害作用を示す図である。縦軸は関節洗浄液中のグリコサミノグリカン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を示している。値は平均値±標準誤差を意味し、##は $P < 0.01$ (偽手術群対比、Aspin-Welch 検定) を表し、*は $P < 0.05$ (生理食塩液投与群対比、Aspin-Welch 検定) を表す。

第19図 プラスミドpKM1334CH-H5の造成工程を示した図である。

第20図 プラスミドpKM1334CH-L4の造成工程を示した図である。

第21図 プラスミドpKANTEX1334の造成工程を示した図である。

第22図 抗FGF-8中和マウス抗体KM1334、抗FGF-8中和キメラ抗体KM3034およびKM3334のマウス乳癌細胞株SC-3細胞のFGF-8依存性増殖に対する中和活性を示した図である。横軸が抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)、縦軸がFGF-8のみを添加した場合の増殖を100%とした場合の相対増殖 (%) を示す。○がKM1334、□がKM3034、△がKM3334、×が陰性対照であるKM2760の活性を示す。

第23図 プラスミドpKM1334HV0の造成工程を示した図である。

第24図 プラスミドpKANTEX1334HV0LV0の造成工程を示した図である。

第25図 抗FGF-8中和キメラ抗体KM3334、抗FGF-8中和CDR移植抗体HV0LV0、HV0LV6、HV6LV6のFGF-8に対する結合活性をELISAにより測定した結果を示した図である。横軸が抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)、縦軸が結合活性 (OD_{415}) を示す。△がKM3334、○がHV0LV0、□がHV0LV6、×がHV6LV6の活性を示す。

第26図 抗FGF-8中和キメラ抗体KM3334、抗FGF-8中和CDR移植抗体HV0LV0、HV0LV6、HV6LV6のFGF-8に対する結合活性をBIAcore 2000により測定した結果を示した図である。横軸が時間 (秒)、縦軸が共鳴シグナル (RU) を示す。

第27図 プラスミドpKM1334LV3-1の造成工程を示した図である。

第28図 プラスミドpKM1334LV4-2の造成工程を示した図である。

第29図 プラスミドpKM1334LV3-2の造成工程を示した図である。

第30図 抗FGF-8中和キメラ抗体KM3034、抗FGF-8中和CDR移植抗体HV0LV0/CHO、HV0LV6/CHO、HV0LV4-1/CHO、HV0LV4-2/CHO、HV0LV3-1/CHO、HV0LV3-2/CHO、HV0LV2-1/CHO、HV0LV2-2/CHOのFGF-8に対する結合活性をBIAcore 2000により測定した結果を示した図である。横軸が時間 (秒)、縦軸が共鳴シグナル (RU) を示す。

第31図 抗FGF-8中和キメラ抗体KM3034、抗FGF-8中和CDR移植抗体HV0LV6/CHO、HV0LV4-1/CHO、HV0LV3-1/CHO、HV0LV2-1/CHOのマウス乳癌細胞株SC-3細胞のFGF-8依存性増殖に対する中和活性を示した図である。横軸が抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)、縦軸がFGF-8のみを添加した場合の増殖を100%とした場合の相対増殖 (%) を示す。○がKM3034、●がHV0LV6/CHO、◇がHV0LV4-1/CHO、△がHV0LV3-1/CHO、□がHV0LV2-1/CHO、×が陰性対照であるKM2760の活性を示す。

第32図 プラスミドpKM1334LV3-3の造成工程を示した図である。

第33図 抗FGF-8中和キメラ抗体KM3034、抗FGF-8中和CDR移植抗体HV0LV6/CHO、

HVOLV3-1/CHO、HVOLV4-3/CHO、HVOLV3-3/CHOのFGF-8に対する結合活性をBIAcore 2000により測定した結果を示した図である。横軸が時間（秒）、縦軸が共鳴シグナル（RU）を示す。

第34図 抗FGF-8中和キメラ抗体KM3034、抗FGF-8中和CDR移植抗体HVOLV6/CHO、HVOLV3-1/CHO、HVOLV4-3/CHO、HVOLV3-3/CHOのマウス乳癌細胞株SC-3細胞のFGF-8依存性増殖に対する中和活性を示した図である。横軸が抗体濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）、縦軸がFGF-8のみを添加した場合の増殖を100%とした場合の相対増殖（%）を示す。○がKM3034、●がHVOLV6/CHO、△がHVOLV3-1/CHO、▲がHVOLV4-3/CHO、■がHVOLV3-3/CHO、×が陰性対照であるKM2760の活性を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の実施例および参考例を示す。

実施例1 ウサギ軟骨細胞のFGF-8による細胞外マトリックスの分解と抗体による阻害

ウサギ関節軟骨細胞は、3週齢の雌性ニュージーランドホワイト種ウサギの両膝および肩より田村らの方法（Tamura T. et al., Eur. J. Pharmacol., 419, 269-274, 2001）に従って分離培養した。すなわち両膝関節および両肩関節を摘出し、骨端軟骨を採取した。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、軟骨を細切し、0.4w/v%アクチナーゼEを含む10vol%FBS添加DMEM（以下、FBSを含むDMEMをFBS/DMEMと記す）中で37°Cで1時間、さらに0.025w/v%コラゲナーゼPを含む10vol%FBS/DMEM中で37°C、5～6時間処理することにより軟骨細胞を軟骨組織から分離し、採取した。採取した軟骨細胞を10vol%FBS/DMEMに懸濁し、100,000個/mLになるように調製した。この軟骨細胞を含む培養液を24ウェルプレートの各ウェルに1mLずつ播種して5%CO₂–95%air気相下、37°Cにて培養した。軟骨細胞がコンフルエントに達した後、培養液を0.5vol%FBS/DMEMに置換し24時間培養した。培養液を除去し、0.5vol%FBS/DMEM（無刺激群）、またはFGF-8〔1、10または100ng/mL；ペプロテック（Peptrotech）社製〕を含む0.5vol%FBS/DMEMを1mL添加して48時間培養した。抗FGF-8中和抗体の作用を検討する際は、FGF-8（100ng/mL）を含む0.5vol%FBS/DMEM（0群）、またはFGF-8（100ng/mL）と抗FGF-8中和抗体KM1334（1、3または10 $\mu\text{g/mL}$ ）とを含む0.5vol%FBS/DMEMを1mL添加

して48時間培養した。培養液を除去し、プレートに残った細胞外マトリックス中のグリコサミノグリカンの量をジメチルメチレンブルー (DMMB) 法 (Chandrasekhar S. et al., Anal. Biochem. 161 103-108, 1987) にて測定した。すなわち、5 mmol/L L-システイン塩酸塩一水和物を加えて活性化した保存用パパイイン緩衝液 (0.1mol/L酢酸ナトリウム、50mmol/L EDTA、pH5.8) に最終濃度が20 $\mu\text{g/mL}$ になるようにパパイイン (シグマアルドリッチ社製) を加え、この液を上記の軟骨細胞を培養したプレートの各ウェルに1 mLずつ添加し、60°Cで一晩消化した。この消化液75 μL に塩酸グアニジン緩衝液 (2.88mol/L塩酸グアニジン、50mmol/L酢酸ナトリウム、pH6.8) 25 μL とDMMB溶液200 μL を添加し、530/590nmの吸光度を測定した。スタンダードとして使用したコンドロイチン硫酸 (クジラ軟骨由来、生化学工業社製) の吸光度から各サンプルのグリコサミノグリカンの濃度を算出した。実験は各条件とも3例ずつ行い、平均値と標準誤差を求めた。

その結果を第1図および第2図に示す。FGF-8は100ng/mLの濃度で細胞外マトリックス中のグリコサミノグリカン残存量を有意に低下させた (第1図)。

このことは、FGF-8が軟骨の細胞外マトリックスの分解を促進する作用を有することを示している。また、抗FGF-8中和抗体KM1334はFGF-8による軟骨の細胞外マトリックスの分解促進を3 $\mu\text{g/mL}$ 以上の抗体濃度で有意に抑制した (第2図)。したがって、抗FGF-8中和抗体の投与により、関節炎における細胞外マトリックスの分解を抑制することができる。

実施例2 FGF-8によるウサギ軟骨細胞からのマトリックスメタロプロテイナーゼ-3の産生の促進と抗体による阻害

ウサギ関節軟骨細胞は、実施例1に記載の方法に従って分離培養した。軟骨細胞がコンフルエントに達した後、培養液を0.5vol%FBS/DMEMに置換し24時間培養した。培養液を除去し、0.5vol%FBS/DMEM (無刺激群)、FGF-8 (100ng/mL) を含む0.5vol%FBS/DMEM (0群) または、FGF-8 (100ng/mL) と抗FGF-8中和抗体KM1334 (1、3または10 $\mu\text{g/mL}$) とを含む0.5vol%FBS/DMEMを1 mL添加して48時間培養した。48時間後、培養液を回収し、培養液中のマトリックスメタロプロテイナーゼ-3濃度をウサギマトリックスメタロプロテイナーゼ-3 ELISA システム (アマシャム・バイオサイエンシズ社製) を用いて測定した。実

験は各条件とも 3 例ずつ行い、平均値と標準誤差を求めた。

その結果を第 3 図に示す。FGF-8は100ng/mLの濃度で軟骨細胞からのマトリックスメタロプロテイナーゼ-3の産生を有意に増加させた（無刺激群対 0 群、 $P=0.0079$ ）。このことは、FGF-8が軟骨細胞からのマトリックスメタロプロテイナーゼ-3の産生誘導を介して細胞外マトリックスの分解を促進する作用を有することを示している。また、抗FGF-8中和抗体KM1334は、FGF-8による軟骨細胞からのマトリックスメタロプロテイナーゼ-3の産生を1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の抗体濃度から有意に抑制した。抗FGF-8中和抗体KM1334の1、3または10 $\mu\text{g/mL}$ での抑制率は、それぞれ72、74、100%であった。したがって、抗FGF-8中和抗体の投与により、軟骨細胞からのマトリックスメタロプロテイナーゼ-3の産生が抑制され、関節炎における細胞外マトリックスの分解を抑制することができる。

実施例 3 ウサギ滑膜細胞のFGF-8による増殖の促進と抗体による阻害

ウサギ滑膜細胞はHamiltonらの方法（Hamilton J. A. and Slywka J., J. Immunol. 126, 851-855, 1981）に準じて採取した。分離した滑膜細胞を10vol% FBSを含むRPMI 1640培地（以下、FBSを含むRPMI 1640培地をFBS/RPMI 1640と記す）中に懸濁し、10,000個ずつ96ウェルの培養プレートに播種した。24時間培養後、各ウェルの培養液を除去し、0.2vol%FBS/RPMI 1640（無刺激群）、またはFGF-8（1、10または100ng/mL）を含む0.2vol%FBS/RPMI 1640を200 μL 添加した。抗FGF-8中和抗体の作用を検討する際は、FGF-8（100ng/mL）を含む0.2vol% FBS/RPMI 1640（0 群）、またはFGF-8（100ng/mL）と抗FGF-8中和抗体KM1334（0.1、0.3、1、3または10 $\mu\text{g/mL}$ ）とを含む0.2vol%FBS/RPMI 1640を各ウェルに200 μL 添加した。48時間培養後、1 ウェルあたり9.25kBqの ^3H チミジンを添加した。さらに24時間培養し、細胞内に取り込まれた ^3H チミジンの放射活性を液体シンチレーションカウンター（1205ベータープレート、パーキンエルマーライフサイエンスジャパン社製）を用いて測定した。実験は各条件とも 6 例ずつ行い、平均値と標準誤差を求めた。

その結果を第 4 図および第 5 図に示す。FGF-8は100ng/mLの濃度でウサギ滑膜細胞への ^3H チミジンの取り込みを有意に促進した（第 4 図）。このことはFGF-8がウサギ滑膜細胞の増殖を促進する作用を有していることを示している。また、抗

FGF-8中和抗体KM1334は、このFGF-8依存性の ^3H チミジンの取り込みの促進を $0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体濃度から有意に抑制した（第5図）。したがって、抗FGF-8中和抗体の投与により、関節炎における滑膜の増殖を抑制することができる。

実施例4 ヒト滑膜細胞のFGF-8による増殖の促進と抗体による阻害

関節リウマチ患者由来のヒト滑膜細胞（東洋紡より購入）を用いて、実施例3と同様の実験を行った。FGF-8の濃度は10、100または500ng/mLで行い、抗FGF-8中和抗体KM1334と共存させるFGF-8の濃度は500ng/mLにした。実験は各条件とも6例ずつ行い、平均値と標準誤差を求めた。

その結果を第6図および第7図に示す。FGF-8は500ng/mLの濃度でヒト滑膜細胞への ^3H チミジンの取り込みを有意に促進した（第6図）。このことはFGF-8がヒト滑膜細胞の増殖を促進する作用を有していることを示している。また、抗FGF-8中和抗体KM1334はこのFGF-8依存性の ^3H チミジンの取り込みの促進を $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体濃度から有意に抑制した（第7図）。したがって、抗FGF-8中和抗体の投与により、関節炎における滑膜の増殖を抑制することができる。

実施例5 抗FGF-8抗体を使用した滑膜の染色

ヒト関節リウマチ患者より摘出した滑膜から、文献の方法（Tanaka A. et al, Cancer Res. 58, 2053-2056, 1998）に従いパラフィン切片を作製し、抗FGF-8抗体KM1334を用いて組織免疫染色を行った。その結果、ヒト関節リウマチ滑膜4例中3例の滑膜細胞でFGF-8が陽性であった。したがって、FGF-8はヒト滑膜に存在することが確認された。また、抗FGF-8抗体を用いてヒト関節リウマチの滑膜細胞を検出することにより、ヒト関節リウマチの判定が可能なが示された。

実施例6 FGF-8の関節内注入による関節炎の誘導

FGF-8を用いて、Sprague-Dawley系ラット（雄性、7週齢、日本チャールス・リバー社）に、以下のようにして関節炎様症状を誘発した。最終濃度が $1 \text{mg}/\text{mL}$ となるように生理食塩液（大塚製薬工場社製）を用いて調製したFGF-8を、ラット膝関節内に $50 \mu\text{L}$ 注入した。また、生理食塩液を膝関節内に $50 \mu\text{L}$ 注入した群を設けた。一群は3匹とした。FGF-8または生理食塩液注入3日後に、Yamadaら

の方法 (Yamada A. et al., *Inflamm. Res.*, 49, 144-146, 2000) に従い、膝関節包内を 0.38w/v% クエン酸ナトリウム含有の生理食塩液 30 μ L で洗浄し、洗浄液を回収した。この操作を 10 回繰り返し、300 μ L の関節洗浄液を回収した。関節洗浄液中のグリコサミノグリカン量を実施例 1 に記載の DMMB 法にて測定した。また、膝関節の膝蓋骨を取り出し、実施例 1 に記載の方法で軟骨部分をパパインで消化し、硬骨の重量を測定した。

その結果を第 8 図および第 9 図に示す。第 8 図は関節洗浄液中のグリコサミノグリカンの濃度を示す。FGF-8 の注入により、関節洗浄液中のグリコサミノグリカン濃度は、生理食塩液注入群の 1.9 倍に上昇した ($P=0.0034$)。このことは、FGF-8 の注入により関節軟骨の細胞外マトリックス分解が亢進することを示している。第 9 図はパパイン消化後の膝蓋骨重量を示す。FGF-8 の注入により、膝蓋骨の重量は、生理食塩液注入群の 40% に低下した ($P=0.0454$)。このことは、FGF-8 の注入により、膝蓋骨の破壊が亢進することを示している。したがって、FGF-8 は、生体において関節破壊を誘導し、関節炎様の症状を引き起こすことが示された。

実施例 7 マウス・コラーゲン関節炎モデルでの評価

マウス・コラーゲン関節炎モデルは、DBA/1J 系マウス (雄性、7 週齢、日本チャールス・リバー社) を用いて、鎌田らの方法 (Kamada H. et al., *Jpn. J. Pharmacol.*, 70, 169-175, 1996) に準じ、以下のようにして作製した。

ウシ軟骨由来 II 型コラーゲン溶液 (コラーゲン技術研修会社製) をフロイント完全アジュバント (ヤトロン社製) と氷冷下で混和してエマルジョンを形成させ、II 型コラーゲンの最終濃度が 1.5mg/mL となるように調製したものを、マウスの尾根部皮内に 100 μ L 注射して感作し、さらに 21 日後に同様の操作で追加免疫を行った。一群は 10 匹とした。KM1334 投与群には、抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 を生理食塩液 (大塚製薬工場社製) で最終濃度 2 mg/mL となるように溶解し、上記マウス・コラーゲン関節炎モデルの初回感作から 21、25、28、32、35 および 39 日目に 1 日 1 回各個体に 200 μ L 腹腔内投与した。また生理食塩液投与群には、抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 溶液の代わりに生理食塩液のみを腹腔内投与した。また陽性コントロールとして、ジクロフェナック投与群には、非ステロイド性抗

炎症薬であるジクロフェナックナトリウム（シグマーアルドリッチ社製）を 0.5w/v%メチルセルロース溶液に最終濃度 0.3mg/mL となるように溶解し、上記マウス・コラーゲン関節炎モデルの初回感作 21 日目から 25 日目、28 日目から 32 日目、および 35 日目から 39 日目に、1 日 1 回、体重 100g あたり 1 mL 経口投与した。また、溶媒投与群として 0.5w/v%メチルセルロース溶液のみを同様に経口投与した。さらに未処置群をおき、これらにはコラーゲン感作および薬物投与を行なわなかった。コラーゲン関節炎における全肢浮腫の経時変化は、一肢 0 から 4 点、全肢合計最高 16 点のスコアリングによって評価した。スコアの基準は、0：正常、1：弱い紅斑を認める、2：弱い腫脹と紅斑を認める、3：強い腫脹と紅斑を認め、触知により温感を認める、4：手指の変形を伴う著明な腫脹を認める、とした。

その結果を第 10 図に示す。抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 投与群では、42 日目で 34% ($P=0.0204$) の有意な関節炎スコアの抑制が認められ、その抑制の程度は陽性コントロールのジクロフェナック投与群と同程度であった（第 10 図）。このことは、抗 FGF-8 中和抗体の投与により、関節炎を抑制することができることを示している。

実施例 8 ラット・アジュバント関節炎モデルでの評価

ラット・アジュバント関節炎モデルは、Lewis 系ラット（雌性、8 週齢、日本チャールス・リバー社）を用いて、Pearson らの方法（Pearson CM. et al., Arth. Rheum., 5, 654-658, 1962）に準じ、以下のようにして作製した。

Mycobacterium butyricum（ディフコ社製）を、最終濃度が 6mg/mL となるように流動パラフィン（和光純薬工業社製）に懸濁し、高圧蒸気滅菌したものを、ラットの右側足蹠部皮内に 100 μ L 注射して感作した。一群は 8～10 匹とした。KM1334 投与群には、抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 を生理食塩液で最終濃度 2mg/mL となるように溶解し、上記ラット・アジュバント関節炎モデルの感作日、ならびに感作から 3、7、10、14、および 17 日目に 1 日 1 回各個体に体重 100g あたり 0.5mL を腹腔内投与した。また生理食塩液投与群には、抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 溶液の代わりに生理食塩液のみを腹腔内投与した。また陽性コントロールとして、ジクロフェナック投与群には、抗炎症薬のジクロフェナックナトリウムを

0.5w/v%メチルセルロース溶液に最終濃度 0.3mg/mL となるように溶解し、アジュバント感作日から4日目、7から11、14から18日目に、1日1回、体重100gあたり1mL経口投与した。メソトレキセート投与群には、代謝拮抗薬である注射用メソトレキセート®50mg（日本ワイスレダリー社製）を0.5w/v%メチルセルロース溶液に最終濃度0.01mg/mLとなるように溶解し、ジクロフェナック投与群と同様に投与した。プレドニゾロン投与群には、ステロイド薬であるプレドニゾロン（シグマ-アルドリッチ社製）を0.5w/v%メチルセルロース溶液に最終濃度0.3mg/mLとなるように懸濁し、ジクロフェナック投与群と同様に投与した。また溶媒投与群として0.5w/v%メチルセルロース溶液のみを同様に経口投与した。さらに未処置群をおき、これらには Mycobacterium butyricum 感作および薬物投与を行わなかった。アジュバント処置足および非処置足の容積は、ラット後肢足浮腫測定装置（TK-101、ユニコム社製）を用いて経時的に測定した。

感作日より21日目の測定結果を第11図ならびに第12図に示す。抗FGF-8中和抗体KM1334投与群では、アジュバント非処置足において、69%（ $P=0.0010$ ）の有意な足容積増加の抑制が見られた（第11図）。ジクロフェナック投与群では45%（ $P<0.0001$ ）、メソトレキセート投与群では90%（ $P<0.0001$ ）、プレドニゾロン投与群では51%（ $P=0.0029$ ）の有意な足容積増加の抑制が見られた（第12図）。すなわち、抗FGF-8中和抗体KM1334は、ジクロフェナックナトリウムやプレドニゾロンを上回る浮腫抑制作用を示した。

感作から20日目より21日目までの24時間蓄尿を用いて、尿中のグリコサミノグリカン、デオキシビリジノリン、ヒドロキシプロリン、およびクレアチニン量を測定した。尿中のグリコサミノグリカン量は、実施例1に記載のDMMB法にて測定した。尿中のヒドロキシプロリン量は、池田らの方法（池田眞悟ら，東京衛研年報．36 277-282，1985）に従って測定した。すなわち、尿0.8mLにアミノ酸分析用塩酸（関東化学社製）0.8mL添加し、110°Cで15時間加水分解した。加水分解した試料0.5mLに1.2mol/Lの水酸化ナトリウム溶液を2mL添加して中和した。中和処理した試料0.5mLにイソプロパノールを1mL添加し、Oxidant溶液を1mL添加してよく攪拌し、5分間室温に静置した。Oxidant溶液は、酢酸ナトリウム三水和物5.7g、クエン酸三ナトリウム二水和物3.75g、クエン酸一水和物0.602gを蒸留水約50mLに溶解し、イソプロパノール38.5mL加え、さらに蒸留

水を加えて 100mL とした酢酸クエン酸緩衝液と、蒸留水を用いて調製した 7 w/v %クロミンT 溶液 (*p*-トルエンスルホンクロロアミドナトリウム三水和物、和光純薬工業社製) を使用時に 4 : 1 の割合で良く混和したものである。その後 Ehrlich 試薬を 1mL 添加してよく攪拌し、恒温器にて 60°C、20 分間加温した。Ehrlich 試薬は、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド (和光純薬工業社製) 17.6g を過塩素酸 (関東化学社製) 20.9mL に溶解し、イソプロパノールを加えて 100mL としたものである。加温後、流水で冷却し、562nm の吸光度を測定した。L-ヒドロキシプロリン (和光純薬工業社製) の吸光度から作成した検量線を用いて、各サンプルのヒドロキシプロリン濃度を算出した。尿中のデオキシピリジノリン量は、オステオリンクス「DPD」 (住友製薬社製) を用いて測定した。尿中クレアチニン量は、クレアチニン-テストワコー (和光純薬工業社製) を用いて測定した。個体間の尿濃度の差を補正するため、各個体毎にグリコサミノグリカン濃度/クレアチニン濃度、デオキシピリジノリン濃度/クレアチニン濃度、あるいはヒドロキシプロリン濃度/クレアチニン濃度の比を算出し、それぞれの指標とした。

その結果を第 13 図から第 17 図に示す。尿中のグリコサミノグリカン量は、生理食塩液投与群において、未処置群の 2.2 倍に上昇した ($P < 0.0001$) (第 13 図)。このことは、関節炎の進展に伴い、軟骨破壊が亢進することを示している。抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 投与群では、尿中グリコサミノグリカン量の上昇に対し、73% ($P = 0.0064$) の有意な抑制が見られた (第 13 図)。メソトレキセート投与群では、79% ($P = 0.0465$) の有意な尿中グリコサミノグリカン量上昇の抑制が見られた。有意ではないが、ジクロフェナック投与群では 40%、プレドニゾン投与群では 18%の尿中グリコサミノグリカン量の低下が認められた (第 14 図)。すなわち、抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 は、メソトレキセートと同程度の軟骨破壊抑制作用を示した。

尿中のデオキシピリジノリン量は、生理食塩液投与群において、未処置群の 1.8 倍に上昇した ($P < 0.0001$) (第 15 図)。このことは、関節炎の進展に伴い、骨破壊が亢進することを示している。抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 投与群では、尿中デオキシピリジノリン量の上昇に対し、41% ($P = 0.0185$) の有意な抑制が見られた。ジクロフェナック投与群では、88% ($P = 0.0016$) の有意な尿中デオ

キシビリジノリン量上昇の抑制が見られた。有意ではないが、メソトレキセート投与群では 34%、プレドニゾン投与群では 38%の尿中デオキシビリジノリン量の低下が認められた（第 16 図）。すなわち、抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 は、メソトレキセートやプレドニゾンを上回る骨破壊抑制作用を示した。

尿中のヒドロキシプロリン量は、生理食塩液投与群において、未処置群の 1.8 倍に上昇した ($P=0.0002$)（第 17 図）。このことは、関節炎の進展に伴い、骨破壊が亢進することを示している。抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 投与群では、尿中ヒドロキシプロリン量の上昇に対し、有意ではないが 48%の低下が見られた。

感作から 21 日目にアジュバント非処置足を脛骨骨幹部で切断して採取し、10vol%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。その後、軟 X 線発生装置 SOFRON SR0-M50（ソフロン社製）を用いて、29kV、4mA、2 分間の条件下で軟 X 線写真を撮影した。実体顕微鏡を用いて写真を観察し、骨破壊をスコアリングした。スコアリングは、踵骨（一辺を 1 部位とし、合計 5 部位）の骨びらの有無を観察し、びらんあり 1 点、なし 0 点として、一肢最高 5 点で行った。

その結果を第 1 表ならびに第 2 表に示す。値は平均値±標準誤差を意味し、*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ 、***は $P<0.001$ （溶媒投与群対比、Wilcoxon 順位和検定）を表す。

第 1 表

投与群	骨破壊スコア	
		(抑制率)
未処置	0.0±0.0	-
生理食塩液	4.4±0.3	-
KM1334	3.2±0.5	27%

第 2 表

投与群	骨破壊スコア	
		(抑制率)
未処置	0.0±0.0	-
溶媒	4.6±0.3	-
ジクロフェナック	3.1±0.6*	33%
メソトレキセート	0.9±0.4***	80%
プレドニゾロン	1.8±0.7**	61%

抗FGF-8中和抗体KM1334投与群では、有意ではないが、骨破壊スコアの27%低下が見られたが、(第1表)。ジクロフェナック投与群では33% (P=0.0362)、メソトレキセート投与群では80% (P=0.0006)、プレドニゾロン投与群では61% (P=0.0032) 骨破壊スコアの低下が認められた(第2表)。すなわち、抗FGF-8中和抗体KM1334は、ジクロフェナックナトリウムと同程度の骨破壊スコアの低下を示した。

ホルマリン固定したアジュバント非処置足のパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン/エオシン染色し、脛骨から中足骨にかけての骨、関節および関節周囲領域を組織病理学的に評価した。関節周囲組織あるいは関節腔への血漿漏出を、一肢0から4点のスコアリングにより評価した。スコアの基準は、0: 変化なし、1: 極軽度の変化を認める、2: 軽度の変化を認める、3: 中等度の変化を認める、4: 重度の変化を認める、とした。

その結果を第3表に示す。値は平均値±標準誤差を意味し、*は P<0.05、**は P<0.01 (生理食塩液投与群対比、Wilcoxon 順位和検定) を表す。

第 3 表

投与群	病理スコア			
	関節周囲への血液漏出 (抑制率)		関節腔への血球・血漿漏出 (抑制率)	
未処置	0.0±0.0	-	0.0±0.0	
生理食塩液	3.4±0.2	-	2.7±0.2	
KM1334	2.0±0.4**	41%	1.6±0.3*	41%

抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 投与群では、関節周囲組織への血漿漏出の 41%低下 ($P=0.0022$)、ならびに関節腔への血球および血漿漏出の 41%低下 ($P=0.0156$) が見られた (第 3 表)。したがって、抗 FGF-8 中和抗体の投与により、関節炎における浮腫形成と、軟骨ならびに骨破壊を抑制することができる。

実施例 9 ラット・モノヨード酢酸誘発変形性関節症モデルでの評価

ラット・モノヨード酢酸誘発変形性関節症モデルは、Sprague-Dawley 系ラット (雄性、7 週齢、日本チャールス・リバー社) を用いて、Guingamp らの方法 (Guingamp C. et al., Arthritis Rheum., 40, 1670-1679, 1997) に準じて、以下のようにして作製した。

最終濃度が 10mg/mL となるように生理食塩液を用いて調製したモノヨード酢酸 (シグマ・アルドリッチ社製) を、ラットの右膝関節内に 25 μ L 注入した。一群は 10 匹とした。KM1334 投与群には、抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 を生理食塩液 (大塚製薬工場社製) で最終濃度 4mg/mL となるように溶解し、モノヨード酢酸注入時に 1 回、体重 100g あたり 0.5mL を腹腔内投与した。また生理食塩液群には、抗体溶液の代わりに生理食塩液のみを腹腔内投与した。さらに偽手術群をおき、これらには生理食塩液を膝関節内に注入し、薬物投与は行わなかった。モノヨード酢酸注入 3 日後に、実施例 6 に記載の方法に従い、関節洗浄液を回収した。関節洗浄液中のグリコサミノグリカン量を実施例 1 に記載の DMMB 法にて測定した。

その結果を第 17 図に示す。モノヨード酢酸の注入により、関節洗浄液中のグリコサミノグリカン濃度は、偽手術群の 1.6 倍に上昇した ($P=0.0014$)。この

ことは、モノヨード酢酸注入により、関節軟骨の細胞外マトリックス分解が亢進することを示している。このモノヨード酢酸注入による関節洗浄液中のグリコサミノグリカン濃度の上昇に対し、抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 投与群では、42% ($P=0.0188$) の有意な抑制が見られた。したがって、抗 FGF-8 中和抗体の投与により、関節炎における関節軟骨の破壊を抑制することができる。

参考例 1 抗FGF-8中和キメラ抗体の生産

1. マウスの抗FGF-8中和抗体のV領域をコードするcDNAの単離と解析

(1) マウスの抗FGF-8中和抗体生産ハイブリドーマ細胞からのmRNAの調製

マウスの抗FGF-8中和抗体を生産するハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451、特開平9-271391) の 1×10^7 細胞より、mRNAの調製キットであるファストトラック mRNA単離キット (インビトロジェン社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、mRNAを約8 μ g調製した。

(2) 抗FGF-8中和マウス抗体のH鎖およびL鎖cDNAライブラリーの作製

上記(1)で取得したKM1334のmRNAの5 μ gから、タイムセーバーcDNA合成キット (アマシャム・バイオサイエンシズ社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、両端にEcoRI-NotIアダプターを有するcDNAを合成した。続いて、 λ ZAPIIクローニング・キット (ストラタジーン社製) を用いてcDNAライブラリーを作製した。まず、cDNA全量を20 μ Lの滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgGクラスの抗体のH鎖に対応する約1.5kbのcDNA断片と κ クラスのL鎖に対応する約1.0kbのcDNA断片をそれぞれ約0.1 μ g回収した。次に、各々の約1.5kbのcDNA断片0.1 μ gおよび約1.0kbのcDNA断片0.1 μ gと、制限酵素EcoRIで消化後仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼで末端を脱リン酸化した λ ZAPIIベクター1 μ gとを、添付の使用説明書に従い連結した。

連結後の各々の反応液のうち4 μ lをGigapack II Packaging Extracts Gold (ストラタジーン社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、 λ ファージにパッケージングし、適量を λ 大腸菌株XL1-Blue (ストラタジーン社製) に感染させて、KM1334のH鎖cDNAライブラリーおよびL鎖cDNAライブラリーとしてそれぞれ約 8.1×10^4 個と、 5.5×10^4 個のファージクローンを取得した。次に各々のファージを常法 (モレキュラー・クローニング 第3版) に従い、ナイロンメンブレン上に固定

した。

(3) 抗FGF-8中和マウス抗体のH鎖およびL鎖cDNAのクローニング

上記(2)で作製したKM1334のH鎖cDNAライブラリーおよびL鎖cDNAライブラリーのナイロンメンブレンを、ECL直接核酸標識検出システム (ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems、アマシャム・バイオサイエンス社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、マウス抗体のC領域のcDNA〔H鎖はマウスC γ 1 cDNAを含むDNA断片 (French D. L. et al., J. Immunol., 146, 2010-2016, 1991)、L鎖はマウスC κ cDNAを含むDNA断片 (Hieter P. A. et al., Cell, 22, 197-207, 1980) をプローブとして検出し、プローブに強く結合したファージクローンをH鎖、L鎖各10クローン取得した。次に、 λ ZAPIIクローニング・キット (ストラタジーン社製) の使用説明書に従い、イン・ビボ・エクシジョン (in vivo excision) により各ファージクローンをプラスミドに変換した。こうして得られた各プラスミドに含まれるcDNAの塩基配列を、ビッグ・ダイ・ターミネーター・キット・バージョン2 (Big Dye Terminator Kit Ver.2、アプライド・バイオシステムズ社製) およびDNAシーケンサーを用いて決定した。その結果、cDNAの5'末端に開始コドンと推定されるATG配列が存在する完全長の機能的なH鎖cDNAを含むプラスミドpKM1334H7-1およびL鎖cDNAを含むプラスミドpKM1334L7-1を得た。

(4) 抗FGF-8中和マウス抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

配列番号1にプラスミドpKM1334H7-1に含まれていたVHの全塩基配列、配列番号2に推定された全アミノ酸配列、配列番号3にプラスミドpKM1334L7-1に含まれていたVLの全塩基配列、配列番号4に推定された全アミノ酸配列をそれぞれ示す。既知のマウス抗体の配列データ (シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト) との比較および精製した抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のH鎖およびL鎖のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーPPSQ-10 (島津製作所製) を用いて自動エドマン分解により解析した結果との比較から、単離した各々のcDNAは分泌シグナル配列を含む抗FGF-8中和マウス抗体KM1334をコードする完全長cDNAであり、H鎖については配列番号2に記載のアミノ酸配列の1から19番目が、L鎖については配列番号4に記載のアミノ酸配列の1から19番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。なお、分泌シグナル配列を除いたVHおよびVLのアミノ酸配列を配列番号5および配列番号6にそれぞれ示した。

次に、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のVHおよびVLのアミノ酸配列の新規性について検討した。配列解析システムとしてGCGパッケージ〔バージョン9.1、ジェネティクス・コンピューター・グループ (Genetics Computer Group) 社製〕を用い、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベース〔PIR-Protein (Release 56.0)〕をBLAST (Altschul S. F. et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) により検索した。その結果、H鎖、L鎖ともに完全に一致する配列は認められず、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のVHおよびVLは新規なアミノ酸配列であることが確認された。

また、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のVHおよびVLのCDRを、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号7、8および9に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号10、11および12に示した。

2. 抗FGF-8中和キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

(1) 抗FGF-8中和キメラ抗体のVHをコードするDNAを含むプラスミドpKM1334CH-H5の構築

参考例1の1. (3) で得られたプラスミドpKM1334H7-1の50ngを鋳型とし、配列番号13、14に記載の塩基配列をそれぞれ有する合成DNA〔ジェンセット (GENSET) 社製〕をプライマーとして終濃度0.3 μ mol/Lol/Lとなるように加え、KODプラス・ポリメラーゼ (東洋紡績社製) に添付の使用説明書に従い、全量50 μ Lでまず94 $^{\circ}$ Cで2分間加熱した後、94 $^{\circ}$ C15秒間、57 $^{\circ}$ C30秒間、68 $^{\circ}$ C1分間の条件で30サイクルのPCRを行った。該反応液を精製した後、滅菌水に溶解し、10単位の制限酵素EcoRI (宝酒造社製) を用いて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.48kbのEcoRI断片 (5' 末端側がEcoRI、3' 末端側は平滑末端) を約0.3 μ g回収した。

次に、プラスミドpBluescript SK(-)の3 μ gに、10単位の制限酵素EcoRI及び10単位の制限酵素EcoRV (宝酒造社製) を37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのEcoRI-EcoRV断片を約2 μ g回収した。

次に、上記で得られたVHをコードするDNAのEcoRI断片0.1 μ gとプラスミドpBluescript SK(-)由来のEcoRI-EcoRV断片0.1 μ gとを全量10 μ lの滅菌水に加え、

ライゲーション・ハイ (Ligation High、東洋紡績社製) を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌XL1-Blue株を形質転換し、第18図に示した抗FGF-8中和キメラ抗体のVHをコードするDNAを含むプラスミドpKM1334CH-H5を得た。

(2) 抗FGF-8中和キメラ抗体のVLをコードするDNAを含むプラスミドの構築

参考例1の1. (3) で得られたプラスミドpKM1334L7-1の50ngを鋳型とし、配列番号15、16に記載の塩基配列をそれぞれ有する合成DNA (ジェンセット社製) をプライマーとして終濃度0.3 $\mu\text{mol/L}$ となるように加え、KODプラス・ポリメラーゼに添付の使用説明書に従い、全量50 μL でまず94°Cで2分間加熱した後、94°C15秒間、57°C30秒間、68°C1分間の条件で30サイクルのPCR反応を行った。該反応液を精製した後、滅菌水に溶解し、10単位の制限酵素EcoRIを用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.45kbのEcoRI断片 (5' 末端側がEcoRI、3' 末端側は平滑末端) を約0.3 μg 回収した。

次に、上記で得られたVLをコードするDNAのEcoRI断片0.1 μg とプラスミドpBluescript SK(-)由来のEcoRI-EcoRV断片0.1 μg を全量10 μl の滅菌水に加え、ライゲーション・ハイを用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌XL1-Blue株を形質転換し、第19図に示した抗FGF-8中和キメラ抗体のVLをコードするDNAを含むプラスミドpKM1334CH-L4を得た。

(3) 抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターpKANTEX1334の構築

W097/10354に記載のヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93と参考例1の2. (1) および(2) で得られたプラスミドpKM1334CH-H5およびpKM1334CH-L4を用いて抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターpKANTEX1334を以下の様にして構築した。

参考例1の2. (1) で得られたプラスミドpKM1334CH-H5の3 μg に、10単位の制限酵素NotI [ニュー・イングランド・バイオラビズ (New England Biolabs) 社製] 及び10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) を添加して37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.48kbのNotI-ApaI断片を約0.2 μg 回収した。

次に、ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の3 μg に、10単位の制限酵素ApaI (宝酒造社製) および10単位の制限酵素NotIを添加して37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約12.8kbのApaI-NotI断片を約2 μg

回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpKM1334CH-H5由来のNotI-ApaI断片0.1 μ gとプラスミドpKANTEX93由来のNotI-ApaI断片0.1 μ gとを全量10 μ Lの滅菌水に加え、ライゲーション・ハイを用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌XL1-Blue株を形質転換し、第20図に示したプラスミドpKANTEX1334Hを得た。

次に、参考例1の2. (2) で得られたプラスミドpKM1334CH-L4の3 μ gに、10単位の制限酵素EcoRI及び10単位の制限酵素BsiWI (ニュー・イングランド・バイオラビズ社製) を添加して37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.45kbのEcoRI-BsiWI断片を約0.2 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX1334Hの3 μ gに、10単位の制限酵素EcoRIおよび制限酵素BsiWIを用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約13.30kbのEcoRI-BsiWI断片を約2 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpKM1334CH-L4由来のEcoRI-BsiWI断片0.1 μ gとプラスミドpKANTEX1334H由来のEcoRI-BsiWI断片0.1 μ gとを全量10 μ Lの滅菌水に加え、ライゲーション・ハイを用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌XL1-Blue株を形質転換し、第20図に示したプラスミドpKANTEX1334を得た。

得られたプラスミドpKANTEX1334の400ngを用い、ビッグ・ダイ・ターミネーター・キット・バージョン2およびDNAシーケンサーを用いて塩基配列の解析を行った。その結果、目的のDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

(4) 抗FGF-8中和キメラ抗体のCHO/DG44細胞を用いた安定発現

上記参考例1の2. (3) で得られた抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターpKANTEX1334を用いて、DHFR遺伝子欠損CHO細胞であるCHO/DG44細胞 (Urlaub G. and Chasin L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980) を宿主とした抗FGF-8中和キメラ抗体の発現を以下の様にして行った。

プラスミドpKANTEX1334の10 μ gを 1.6×10^6 細胞のCHO/DG44細胞へエレクトロポレーション法 (Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140, 1990) により導入後、10~30mLのIMDM-1 \times HTサプリメント-dFBS(10) (透析FBS (以下dFBSと

略す)を10%と1×HTサプリメント(インビトロジェン社製)とを含むIMDM培地(インビトロジェン社製)に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート(旭テクノグラス社製)に100 μ L/ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、培養液を培地IMDM-dFBS(10)〔HTサプリメントを含まずに10% dFBSを含むIMDM培地〕と交換してさらに1～2週間培養した。耐性コロニーが出現しコンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗FGF-8中和キメラ抗体の抗原結合活性を下記の参考例1の2.(6)に示すELISAにより測定した。

培養上清中に抗FGF-8中和キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については24ウェルプレートに播種し、dhfr遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、dhfrの阻害剤であるメソトレキセート(シグマアルドリッチ社製、以下MTXと略す)を50 nmol/L含むIMDM-dFBS(10)で2週間培養した。更にMTX濃度を200 nmol/L、500 nmol/Lと高くし、それぞれの段階で2週間ずつ培養を行い、500 nmol/L MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗FGF-8中和キメラ抗体の抗原結合活性を参考例1の2.(6)に示すELISAにより測定した。最終的に、500 nmol/LのMTXを含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、抗FGF-8中和キメラ抗体を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、限界希釈法による単一細胞化(クローン化)を行い、抗FGF-8中和キメラ抗体の発現の最も高い形質転換細胞クローンをKM3034と命名した。なお、KM3034は平成13年12月26日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1-1 中央第6)にFERM BP-7836として寄託されている。

(5) 抗FGF-8中和キメラ抗体のYB2/0細胞を用いた安定発現

上記参考例1の2項(3)で得られた抗FGF-8中和キメラ抗体発現ベクターpKANTEX1334を用いて抗FGF-8中和キメラ抗体のラットハイブリドーマYB2/0細胞(ATCC No. CRL-1662)での発現を以下の様に行なった。

プラスミドpKANTEX1334の10 μ gを4×10⁶細胞のYB2/0細胞へエレクトロポレーション法により導入後、40mLのハイブリドーマ-SFM-FBS(5)〔5%FBS(PAALABORATRIEZ社製)を含むハイブリドーマ-SFM培地(インビトロジェン社製)〕に懸濁し、96ウェル培養用プレート(住友ベークライト社製)に200 μ L/ウ

エルずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 1mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 FGF-8 中和キメラ抗体の抗原結合活性を参考例 1 の 2. (6) に示す ELISA により測定した。

培養上清中に抗 FGF-8 中和キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、1mg/mL G418 および 50nmol/L MTX を含むハイブドーマ-SFM-FBS(5)培地に 1~2×10⁵ 細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェルプレート〔グライナー (Greiner) 社製〕に 1mL ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 FGF-8 中和キメラ抗体の抗原結合活性を参考例 1 の 2. (6) に示す ELISA により測定した。

培養上清中に抗 FGF-8 中和キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を上昇させ、終濃度が 1mg/mL の G418、200nmol/L の MTX を含むハイブドーマ-SFM-FBS(5) 培地で増殖可能かつ、抗 FGF-8 中和キメラ抗体を高発現する形質転換株 5-D を得た。得られた形質転換株について、限界希釈法によるクローン化を行い、抗 FGF-8 中和キメラ抗体の発現の最も高い形質転換細胞株を得た。得られた形質転換細胞株を KM3334 と命名した。

(6) ELISA による、抗体の FGF-8 部分ペプチドに対する結合活性の測定

抗 FGF-8 抗体が反応し得るヒト FGF-8 の部分ペプチドとして、抗 FGF-8 中和マウス抗体 KM1334 (特開平 9-271391) の抗原ペプチドと同じ配列である配列番号 17 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを合成した。配列番号 17 は、ヒト FGF-8 のアミノ酸配列の 23~46 番目の配列の C 末端に、コンジュゲート作製のためにシステイン残基を付加した配列である。以下、このペプチドを化合物 1 と呼ぶ。ELISA に用いるため、以下の方法で牛血清アルブミン (ナカライテスク社製、以下、BSA と略す) とのコンジュゲート (以下、BSA-化合物 1 と呼ぶ) を作製した。すなわち、10mg の BSA を含む PBS 900μL に、100μL の 25mg/mL SMCC [4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサノ-1-カルボキシリクアシッド N-ヒ

ドロキシサクシンイミドエステル、シグマールドリッチ社製〕の DMSO 溶液を攪拌しながら滴下し、30 分間ゆっくりと攪拌した。25mL の PBS で平衡化したゲルろ過カラム (NAP-10 カラム) に反応液 1mL を載せ、1.5mL の PBS で溶出させた溶出液を BSA-SMCC 溶液とした。各画分の BSA 濃度は 280nm の吸光度で測定した。次に、1.0 mg の化合物 1 に 200 μ L DMSO を加え、次いで 800 μ L PBS を加えて完全に溶解させた後、前述の BSA-SMCC 溶液 (BSA 換算 2.5mg) を攪拌下で添加して室温で 3 時間ゆっくり攪拌した。反応液を PBS に対して 4°C、一晚透析し、最終濃度 0.05% となるようにアジ化ナトリウムを添加した後、孔径 0.22 μ m フィルターでろ過した溶液を BSA-化合物 1 溶液とした。

96 ウェルの ELISA 用プレート (グライナー社製) に、上述のように調製した BSA-化合物 1 溶液を 0.5~1.0 μ g/mL の濃度で 50 μ L/ウェルずつ分注し、4°C で一晚放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA を含む PBS (以下、BSA-PBS と呼ぶ) を 100 μ L/ウェルずつ加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを 0.05%Tween を含む PBS (以下、Tween-PBS と呼ぶ) で洗浄後、形質転換株の培養上清あるいは精製抗体を 50 μ L/ウェルずつ加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、BSA-PBS で 3000~6000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体溶液 [アメリカン・クォーレックス (American Qualex) 社製] を二次抗体溶液として、50 μ L/ウェルずつ加え、室温で 1 時間反応させた。反応後の各ウェルを、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [0.55g の 2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムを 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に 30%過酸化水素水を 1 μ L/mL の割合で添加した溶液] を 50 μ L/ウェルずつ加えて発色反応させ、5 分後に 5%SDS 溶液を 50 μ L/ウェルずつ加えて反応を停止した。その後、415nm の吸光度を測定した。

3. 抗 FGF-8 中和キメラ抗体の精製

(1) CHO/DG44 細胞由来の発現細胞の培養及び抗体の精製

参考例 1 の 2. (4) で得られた抗 FGF-8 中和キメラ抗体を発現する形質転換細胞株 KM3034 を 500nmol/L MTX を含む IMDM-dFBS(10)培地に 1~2 $\times 10^5$ 細胞/mL となるように懸濁し、175cm² フラスコ (グライナー社製) に 40mL ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 5~7 日間培養し、コンフルエントに達し

た時点で培養上清を除去し、20mL の PBS にて細胞を洗浄した。PBS を除去し、40mL の EX-CELL 301 培地 (JRH バイオサイエンス社製) を加え、5%CO₂ インキュベーター内で 37°C にて 7~14 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりプロセップ-A [Prosep-A、ミリポア社製] カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 FGF-8 中和キメラ抗体を精製した。得られた抗 FGF-8 中和キメラ抗体は KM3034 と名付けた。

(2) YB2/0 細胞由来の発現細胞の培養及び抗体の精製

参考例 1 の 2. (5) で得られた抗 FGF-8 中和キメラ抗体を発現する形質転換細胞株 KM3334 を、175cm² フラスコで、200nmol/L MTX および 5%ダイゴ GF21 (和光純薬社製) を含むハイブリドーマ-SFM 培地を用いて、5%CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養した。8~10 日間培養して回収した培養上清より、プロセップ-A カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 FGF-8 中和キメラ抗体を精製した。得られた抗 FGF-8 中和キメラ抗体は KM3334 と名付けた。

4. 精製した抗 FGF-8 中和キメラ抗体の解析

参考例 1 の 3. で得られた各種動物細胞で発現、精製した 2 種類の抗 FGF-8 中和キメラ抗体 KM3034 および KM3334 の各 4 μ g を公知の方法 (Nature, 227, 680, 1970) に従って SDS-電気泳動にかけ、分子量及び精製度を解析した。精製した各抗 FGF-8 中和キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150Kd の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖及び L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎖: 約 49Kd、L 鎖: 約 23Kd、分子全体: 約 144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、分子量約 50Kd の H 鎖と約 25Kd の L 鎖にそれぞれ分解されるという報告 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996) と一致し、これにより抗 FGF-8 中和キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

5. 精製した抗 FGF-8 中和キメラ抗体の中和活性評価

精製した抗 FGF-8 中和キメラ抗体の FGF-8 中和活性の評価は、以下に示すマウス

乳癌細胞株SC-3のFGF-8依存性増殖の抑制効果 (Tanaka A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8928-8932, 1992) により測定した。即ち、活性炭処理をしたFBSを2%の濃度で含むDMEM:Ham's F12 (1:1)培地〔DMEM培地とHam's F12培地 (インビトロジェン社製) とを1:1の割合で混合した培地〕に、SC-3細胞を 3.0×10^4 細胞/mLの濃度で懸濁し、150 μ L (4.5×10^3 細胞) /ウェルずつ96ウェルプレートに播種した。5%CO₂インキュベーター内で37°C、18時間培養後、100 μ L/ウェルの試験培地を用いて培地交換した。試験培地は、50ng/mLのFGF-8 (R&D社製) 及び各希釈濃度の抗FGF-8中和キメラ抗体を、BSAを0.1%で含むDMEM:Ham's F12 (1:1)培地に溶解することにより作製した。また、陰性対照の抗体としてW001/64754に記載のヒトケモカインCCR4に対するキメラ抗体KM2760を用いた。5%CO₂インキュベーター内で37°C、48時間培養後、新たに調製した試験培地と交換し、さらに48時間培養した。WST-1試薬 (ロシュ社製) を10 μ L/ウェルずつ添加し、軽く攪拌して5%CO₂インキュベーター内で37°C、1時間培養後、吸光度 (OD_{450/650}) を測定した。第21図において、横軸は添加した抗体濃度、縦軸は50ng/mLのFGF-8のみの添加時の増殖に対する相対増殖 (%) を示す。50ng/mLのFGF-8のみの添加時の増殖に対する相対増殖 (%) は下記の式により算出された。

(式) FGF-8 添加時の増殖に対する相対増殖 (%)

$$= \{ (\text{FGF-8 及び抗体添加時の吸光度} - \text{FGF-8 及び抗体未添加時の吸光度}) / (\text{FGF-8 のみ添加時の吸光度} - \text{FGF-8 及び抗体未添加時の吸光度}) \} \times 100$$

第 21 図に示したように、抗 FGF-8 中和マウス抗体 KM1334、抗 FGF-8 中和キメラ抗体 KM3034 および KM3334 は、いずれも同等の SC-3 細胞増殖阻害活性を示し、キメラ抗体化による中和活性の低下は認められなかった。

参考例 2 抗FGF-8中和CDR移植抗体の作製

1. 抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするDNAの構築

(1) 抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の設計

まず、抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列を以下の様にして設計した。参考例 1 の 1 項 (4) で同定した抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のVHのCDRのアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVHをそのアミノ酸配列の相同性から3種類のサ

ブグループ (HSG I~III) に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している (シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)。それら共通配列は、ヒトにおいてより免疫原性が低下する可能性が考えられることから、それら共通配列を基に抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列を設計することとした。より活性の高い抗FGF-8中和CDR移植抗体を作製するために、設計にあたってはヒト抗体のVHの3種類のサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列のうち、KM1334のVHのFRのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFRのアミノ酸配列を選択した。第4表には、相同性の検索結果を示した。第4表に示した様に、KM1334のVH領域のFRのアミノ酸配列はサブグループIと最も高い相同性を有していた。

第 4 表

ヒト抗体のVHの各サブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列と
KM1334のVHのFRのアミノ酸配列との相同性

<u>HSG I</u>	<u>HSG II</u>	<u>HSG III</u>
79.3%	51.7%	59.8%

以上の結果から、ヒト抗体のVHのサブグループIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のVHのCDRのアミノ酸配列を移植し、配列番号18に記載の抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV.0を設計した。

次に、抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列を以下の様にして設計した。参考例1の1.(4)で同定した抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のVLのCDRのアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVLのFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVLをそのアミノ酸配列の相同性から4種類のサブグループ (HSG I~IV) に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している (シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)。そこでVHの場合と同様にして、ヒト抗体のVLの4種類のサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列のうち、KM1334のVLのFRのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFRのアミノ酸配列を選択した。

第5表には、相同性の検索結果を示した。第5表に示した様に、KM1334のVLのFRのアミノ酸配列はサブグループIIと最も高い相同性を有していた。

第 5 表

ヒト抗体のVLの各サブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列と
KM1334のVLのFRのアミノ酸配列との相同性

HSG I	HSG II	HSG III	HSG IV
66.3%	83.8%	66.2%	73.8%

以上の結果から、ヒト抗体のVLのサブグループIIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、配列番号19に記載の抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列LV.0を設計した。

上記で設計した抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV.0およびVLのアミノ酸配列LV.0は、選択したヒト抗体のFRのアミノ酸配列に抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のCDRのアミノ酸配列のみを移植した配列である。多くの場合、ヒト型CDR移植抗体では、マウス抗体のCDRのアミノ酸配列の移植のみでは結合活性が低下してしまう。それを回避するため、ヒト抗体とマウス抗体とのFRアミノ酸配列を比較し、異なっているFRのアミノ酸残基のうち、結合活性に影響を与えと考えられるアミノ酸残基をCDRのアミノ酸配列とともに移植することが行われている。そこで、本参考例においても、結合活性に影響を与えと考えられるFRのアミノ酸残基を同定することを検討した。

まず、上記で設計した抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV.0およびVLのアミノ酸配列LV.0よりなる抗体V領域（HV0LV0）の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製に関してはソフトウェアAbM〔オックスフォード・モレキュラー（Oxford Molecular）社製〕を、三次元構造の表示についてはソフトウェアPro-Explore（オックスフォード・モレキュラー社製）あるいはRasMol〔グラクソ（Glaxo）社製〕を用いてそれぞれ添付の使用説明書に従い、行った。また、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のV領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、HV0LV0のVHおよびVL

のFRのアミノ酸配列において、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334と異なっているアミノ酸残基について順次、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334の相当する位置に見られるアミノ酸残基へ改変したアミノ酸配列からなる改変体のV領域三次元構造モデルを同様にして構築し、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334、HV0LV0および改変体のV領域の三次元構造を比較した。その結果、HV0LV0のFRのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の活性に影響を与えと考えられる残基として、HV.0において12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、87番目のArg、95番目のTyrを、LV.0において2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeu、92番目のTyrを選択し、アミノ酸を改変することとした。これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも1つ以上をマウス抗体KM1334に見られるアミノ酸残基へ改変し、様々な改変を有するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLを以下のように設計した。

具体的には、VHとしては、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、95番目のTyrの6残基をそれぞれマウス抗体KM1334に見られるアミノ酸残基であるAla、Arg、Arg、Ser、Ile、Pheに改変した配列番号20に記載のアミノ酸配列HV.6を設計した。VLとしては、2番目のIle、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeu、92番目のTyrの6残基をそれぞれマウス抗体KM1334に見られるアミノ酸残基であるVal、Ser、Leu、Lys、Val、Pheに改変した配列番号21に記載のアミノ酸配列LV.6を設計した。

(2) 抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHをコードするDNAの構築

参考例2の1項(1)で設計した抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV.0をコードするDNAをPCRを用いて以下の様にして構築した。

まず、設計したアミノ酸配列に抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のH鎖の分泌シグナル配列(配列番号2の1～19番目のアミノ酸配列)を繋げた。次に、得られたアミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度(シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト)を考慮し、対応する遺伝子コドンを選定した。決定した遺伝子コドンをつなぎ、完全な抗体V領域のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を設計した。この塩基配列

の5'末端と3'末端にヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列を含む配列を付加し、さらに5'末端にM13プライマーRV（宝酒造社製）の配列、3'末端にM13プライマーM4（宝酒造社製）の配列と相補的な配列を付加した。設計した塩基配列（配列番号22）を5'末端側から141塩基ずつ、末端の20塩基が重複する様に4つに区切り、それぞれの配列のセンス鎖、アンチセンス鎖、センス鎖、アンチセンス鎖に相当する、配列番号23～26に示す配列からなる4本のDNAを化学合成した（ジェンセット社製）。

KODポリメラーゼに添付の使用説明書に従い、0.1 μ mol/Lの各合成DNA、0.5 μ mol/LのM13プライマーRV、0.5 μ mol/LのM13プライマーM4および2.5単位のKODポリメラーゼ（東洋紡績社製）を用いて全量50 μ LのPCR反応液を調製し、PCRを行った。反応条件は、94 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した後、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、50 $^{\circ}$ Cで30秒間、74 $^{\circ}$ Cで60秒間のサイクルを25サイクル行い、さらに74 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。該反応液をエタノール沈殿した後、滅菌水に溶解し、10単位の制限酵素EcoRIおよび10単位の制限酵素SpeI（宝酒造社製）を用いて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.47kbのEcoRI-SpeI断片を約0.3 μ g回収した。

次に、3 μ gのプラスミドpBluescript II SK(-)（ストラタジーン社製）に、10単位の制限酵素EcoRIおよび10単位の制限酵素SpeIを37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.95kbのEcoRI-SpeI断片を約2.9 μ g回収した。

次に、上記で得られた抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHをコードするPCR産物のEcoRI-SpeI断片0.1 μ gとプラスミドpBluescript II SK(-)のEcoRI-SpeI断片0.1 μ gとを全量10 μ Lの滅菌水に加え、ライゲーション・ハイを用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株の10個のクローンより各プラスミドDNAを調製し、ビッグ・ダイ・ターミネーター・キット・バージョン2およびDNAシーケンサーを用いて塩基配列の解析を行った。塩基配列を解析した結果、目的の塩基配列を有する第22図に示したプラスミドpKM1334HV0を得た。

また、参考例2の1.（1）で設計した抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV.6をコードするDNAを、上記HV.0をコードするDNAと同様にして設計し（配列番号27）、配列番号28～31に示す配列からなる4本の合成DNA（ジェンセット

社製)を用いて、上記と同様にしてPCRにより構築した。pKM1334HV0と同様の過程をとり、HV.6をコードするDNAを含むプラスミドpKM1334HV6を得た。

(3) 抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLをコードするDNAの構築

参考例2の1.(1)で設計した抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列LV.0をコードするDNAをHV.0をコードするDNAと同様にして設計した(配列番号32)。ただし、合成DNAの設計の際、分泌シグナル配列としては、抗FGF-8中和マウス抗体KM1334のL鎖の分泌シグナル配列(配列番号4の1~19番目のアミノ酸配列)を用いた。HV.0をコードするDNAと同様にして、それぞれ配列番号33から36の配列からなる4本の合成DNA(ジェンセット社製)を用いたPCRにより、LV.0をコードするDNAを構築した。pKM1334HV0と同様の過程をとり、LV.0をコードするDNAを含むプラスミドpKM1334LV0を得た。

また、参考例2の1.(1)で設計した抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列LV.6をコードするDNAをLV.0をコードするDNAと同様にして設計し(配列番号37)、それぞれ配列番号38から41の配列からなる4本の合成DNA(ジェンセット社製)を用いて上記と同様にしてPCRにより構築した。pKM1334HV0と同様の過程をとり、LV.6をコードするDNAを含むプラスミドpKM1334LV6を得た。

2. 抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターの構築

W097/10354に記載のヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93と参考例2の1.(2)および(3)で得られたプラスミドpKM1334HV0およびpKM1334LV0とを用いて抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX1334HV0LV0を以下の様にして構築した。

参考例2の1.(2)で得られたプラスミドpKM1334HV0の3 μ gに、10単位の制限酵素ApaI及び10単位の制限酵素NotI(宝酒造社製)を用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.47kbのApaI-NotI断片を約0.3 μ g回収した。

次に、ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93の3 μ gに、10単位の制限酵素ApaI及び10単位の制限酵素NotIを37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約12.8kbのApaI-NotI断片を約2 μ g回収した。

次に、上記で得られたpKM1334HV0由来のNotI-ApaI断片0.1 μ gとプラスミドpKANTEX93由来のNotI-ApaI断片0.1 μ gとを全量10 μ Lの滅菌水に加え、ライゲーション

ヨン・ハイを用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、第23図に示したプラスミドpKANTEX1334HV0を得た。

次に、参考例2の1. (3) で得られたプラスミドpKM1334LV0の3 μ gに、10単位の制限酵素EcoRI及び10単位の制限酵素BsiWIを37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.45kbのEcoRI-BsiWI断片を約0.3 μ g回収した。

次に、上記で得られたプラスミドpKANTEX1334HV0の3 μ gに、10単位の制限酵素EcoRI及び制限酵素BsiWIを37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約13.30kbのEcoRI-BsiWI断片を約2 μ g回収した。

次に、上記で得られたpKM1334LV0由来のEcoRI-BsiWI断片0.1 μ gとプラスミドpKANTEX1334HV0由来のEcoRI-BsiWI断片0.1 μ gとを全量10 μ Lの滅菌水に加え、ライゲーション・ハイを用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、第23図に示した発現ベクターpKANTEX1334HV0LV0を得た。

得られたプラスミドの400ngに対して、ビッグ・ダイ・ターミネーター・キット・バージョン2およびDNAシーケンサーを用いて塩基配列の解析を行った結果、目的のDNAがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

また、参考例2の1. (2) で得られたプラスミドpKM1334HV0および参考例2の1. (3) で得られたプラスミドpKM1334LV6を用いて上記と同様の方法により、発現ベクターpKANTEX1334HV0LV6を構築した。

また、参考例2の1. (2) で得られたプラスミドpKM1334HV6および参考例2の1. (3) で得られたプラスミドpKM1334LV6を用いて上記と同様の方法により、発現ベクターpKANTEX1334HV6LV6を構築した。

3. 抗FGF-8中和CDR移植抗体のYB2/0細胞を用いた安定発現

参考例2の2. で得られた抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX1334HV0LV0、pKANTEX1334HV0LV6、pKANTEX1334HV6LV6をそれぞれ用いて各種抗FGF-8中和CDR移植抗体のYB2/0細胞での安定発現を上記参考例1の2. (5) に記載の方法に従い、行った。

4. 抗FGF-8中和CDR移植抗体の精製

参考例 2 の 3 . で得られた各種抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体を発現する YB2/0 細胞由来の形質転換株の培養及び上清からの抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の精製を上記参考例 1 の 3 . (2) に記載の方法に従い、行った。pKANTEX1334HV0LV0 を導入した形質転換株由来の抗体を HV0LV0、pKANTEX1334HV0LV6 を導入した形質転換株由来の抗体を HV0LV6、pKANTEX1334HV6LV6 を導入した形質転換株由来の抗体を HV6LV6 とそれぞれ名付けた。

5 . 精製した抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の解析

参考例 2 の 4 . で得られた各種抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の SDS-PAGE を上記参考例 1 の 4 . に記載の方法に従い、行った。その結果、いずれの抗体も正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

6 . ELISAによる、抗FGF-8中和CDR移植抗体のFGF-8に対する結合活性の測定

参考例 2 の 4 . で得られた各種抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の FGF-8 に対する結合活性は、上記参考例 1 の 2 . (6) に記載の ELISA により測定した。陽性対照として、参考例 1 の 3 . (2) で得られた YB2/0 細胞由来の抗 FGF-8 中和キメラ抗体 KM3334 を用いた。その結果を第 24 図に示した。第 24 図に示したように、いずれの抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体も、KM3334 と同等の FGF-8 結合活性を示し、CDR 移植化による明らかな結合活性の低下は認められなかった。

7 . 抗FGF-8中和CDR移植抗体のFGF-8に対する結合活性の測定

参考例 2 の 4 . で得られた各種抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の FGF-8 に対する結合活性をより詳細に検討するため、BIAcore 2000 [ピアコア (BIACORE) 社製] を用いて各種抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の FGF-8 に対する結合活性を以下のようにして測定、比較した。陽性対照として、参考例 1 の 3 . (2) で得られた YB2/0 細胞由来の抗 FGF-8 中和キメラ抗体 KM3334 を用いた。

以下、サンプルの希釈および測定中の緩衝液としては HBS-EP (ピアコア社製) を使用した。まず、センサーチップ CM5 (ピアコア社製) をセットし、10mmol/L 酢酸緩衝液 (pH4.0) を用いて 31.25 μ g/mL に溶解した FGF-8 (R & D 社製) をアミンカップリング法によりセンサーチップ表面に固定化した。共鳴シグナル (RU) を指標とした固定化量は 4498RU であった。

FGF-8 固定化フローセルに 20 μ L/分の流速で、各種抗体溶液を 60 μ L 添加し、その後、3 分間に渡り解離反応をモニターした。解離反応後、20 μ L の 10mmol/L

Glycine-塩酸溶液 (pH1.5) を2回連続してフローセルに添加し、チップ表面を再生させた。このサイクルを各種濃度 (50-0.068 μ g/mL) の抗体溶液について行い、各種濃度におけるセンサーグラムを得た。各々の抗体のセンサーグラムは、陰性対照としてGD3に対するキメラ抗体KM871 (Shitara K. et al., Cancer Immunol. Immunother., 36, 373-380, 1993) を用いて得られたセンサーグラムを差し引くことにより特異的な反応のセンサーグラムとした。第25図に50 μ g/mLの各種抗体のセンサーグラムを示した。センサーグラムから明らかなように、いずれの抗体も解離反応時にほとんど解離が認められず、正確な解離速度定数を求めることが困難であった。そこで、各種抗体の結合活性の比較は、結合反応時の結合〔共鳴シグナル (RU) 〕の高さを比較することにより、行った。その結果、第25図に示したように、キメラ抗体KM3334が最も高い結合反応を示し、CDR移植抗体HV0LV6は、KM3334と同等の高い結合反応を示した。一方、CDR移植抗体HV0LV0およびHV6LV6は、KM3334およびHV0LV6と比較して若干低い結合反応を示した。以上の結果は、ELISAでは認められなかった抗体間の結合活性の比較がBIAcore 2000を用いることにより可能であること、そして、VLのFRの6アミノ酸残基の改変により、CDR移植抗体の結合活性がキメラ抗体と同等レベルに回復することを示している。また、VHのFRの6アミノ酸残基については、結合活性の回復に対する効果は認められなかった。

キメラ抗体KM3334と同等の高い結合反応を示したYB2/0細胞由来のCDR移植抗体HV0LV6をKM8037と命名し、また、KM8037を高発現するYB2/0細胞由来の形質転換細胞株も同様にKM8037と命名した。なお、形質転換細胞株KM8037は平成14年6月20日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (〒305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1-1中央第6) にFERM BP-8084として寄託されている。

参考例3 より免疫原性の低い抗FGF-8中和CDR移植抗体の作製 (1)

参考例2の結果より、VLのFRにマウス抗体KM1334由来の6アミノ酸残基の改変を有する抗FGF-8中和CDR移植抗体HV0LV6は、キメラ抗体と同等の結合活性を示すことが明らかとなった。そこで、さらにこれら6残基の活性回復に対する効果を検討し、十分な活性を有し、かつマウス抗体由来のアミノ酸残基の少ない、より免疫

原性の低下が期待される抗FGF-8中和CDR移植抗体の作製を以下のようにして行った。

1. VLのアミノ酸配列の設計

上記の6アミノ酸残基について、以下のような改変を有する6種類のVLのアミノ酸配列を設計した。いずれもLV.0のアミノ酸残基からの改変を示した。

LV.4-1では、2番目のIle、50番目のGln、51番目のLeu、92番目のTyrの4残基をそれぞれマウス抗体KM1334に見られるアミノ酸残基であるVal、Lys、Val、Pheに改変した。

LV.4-2では、2番目のIle、14番目のThr、15番目のPro、92番目のTyrの4残基をそれぞれマウス抗体KM1334に見られるアミノ酸残基であるVal、Ser、Leu、Pheに改変した。

LV.3-1では、2番目のIle、51番目のLeu、92番目のTyrの3残基をそれぞれマウス抗体KM1334に見られるアミノ酸残基であるVal、Val、Pheに改変した。

LV.3-2では、14番目のThr、15番目のPro、92番目のTyrの3残基をそれぞれマウス抗体KM1334に見られるアミノ酸残基であるSer、Leu、Pheに改変した。

LV.2-1では、51番目のLeu、92番目のTyrの2残基をそれぞれマウス抗体KM1334に見られるアミノ酸残基であるVal、Pheに改変した。

LV.2-2では、2番目のIle、92番目のTyrの2残基をそれぞれマウス抗体KM1334に見られるアミノ酸残基であるVal、Pheに改変した。

LV.4-1、LV.4-2、LV.3-1、LV.3-2、LV.2-1、LV.2-2のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号42～47に示した。

2. VLをコードするDNAの構築

参考例3の1. で設計した抗FGF-8中和CDR移植抗体の各種VLのアミノ酸配列をコードするDNAは以下のようにして構築した。

(1) LV.4-1をコードするDNAの構築

LV.4-1をコードするDNAは、それぞれ配列番号38、34、40、41の配列からなる4本の合成DNA（ジェンセット社製）を用いて参考例2の1.（3）に記載の方法に従い、構築した。その結果、LV.4-1をコードするDNAを含むプラスミドpKM1334LV4-1を得た。

(2) LV.3-1をコードするDNAの構築

参考例 2 の 1. (3) で得られたプラスミド pKM1334LV6 の 50ng を鋳型とし、M13 プライマー RV および配列番号 48 の塩基配列からなる合成 DNA (ジェンセット社製) をプライマーとして終濃度 $0.3 \mu\text{mol/L}$ となるように加え、KOD ポリメラーゼに添付の使用説明書に従い、全量 $50 \mu\text{L}$ でまず 94°C で 2 分間加熱した後、 94°C で 15 秒間、 50°C で 30 秒間、 68°C で 1 分間の条件のサイクルで 35 サイクルの PCR を行った。該反応液を精製した後、滅菌水に溶解し、10 単位の制限酵素 KpnI (宝酒造社製) および 10 単位の制限酵素 SpeI を用いて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.22kb の KpnI-SpeI 断片を約 $0.3 \mu\text{g}$ 回収した。

次に、参考例 3 の 2. (1) で得られたプラスミド pKM1334LV4-1 の $3 \mu\text{g}$ を 10 単位の制限酵素 KpnI を用いて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.21kb の KpnI 断片を約 $0.2 \mu\text{g}$ 回収した。

さらに、 $3 \mu\text{g}$ のプラスミド pBluescript II SK(-) に、10 単位の制限酵素 KpnI および 10 単位の制限酵素 SpeI を 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 2.95kb の KpnI-SpeI 断片を約 $2 \mu\text{g}$ 回収した。

上記で得られた VL DNA の KpnI-SpeI 断片 $0.1 \mu\text{g}$ 、プラスミド pKM1334LV4-1 由来の KpnI 断片 $0.1 \mu\text{g}$ 、およびプラスミド pBluescript II SK(-) 由来の KpnI-SpeI 断片 $0.1 \mu\text{g}$ を全量 $10 \mu\text{l}$ の滅菌水に加え、ライゲーション・バイを用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、第 26 図に示した LV.3-1 をコードする DNA を含むプラスミド pKM1334LV3-1 を得た。

(3) LV.2-1 をコードする DNA の構築

プラスミド pKM1334LV4-1 の代わりに参考例 2 の 1. (3) で得られたプラスミド pKM1334LV0 を用いる以外は、参考例 3 の 2. (1) に記載の方法と同様の方法で、LV.2-1 をコードする DNA を含むプラスミド pKM1334LV2-1 を得た。

(4) LV.2-2 をコードする DNA の構築

プライマーとして配列番号 48 に記載の合成 DNA の代わりに配列番号 49 に記載の合成 DNA を用いる以外は、参考例 3 の 2. (1) に記載の方法と同様の方法で、LV.2-2 をコードする DNA を含むプラスミド pKM1334LV2-2 を得た。

(5) LV.4-2 をコードする DNA の構築

参考例 3 の 2. (4) で得られたプラスミド pKM1334LV2-2 の $3 \mu\text{g}$ を 10 単位の制

制限酵素KpnIを用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.16kbのKpnI断片を約2 μ g回収した。

次に、参考例2の1.(3)で得られたプラスミドpKM1334LV6の3 μ gを10単位の制限酵素KpnIを用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.21kbのKpnI断片を約0.2 μ g回収した。

上記で得られたプラスミドpKM1334LV2-2由来のKpnI断片0.1 μ gとプラスミドpKM1334LV6由来のKpnI断片0.1 μ gとを全量10 μ lの滅菌水に加え、ライゲーション・ハイを用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、第27図に示したLV.4-2をコードするDNAを含むプラスミドpKM1334LV4-2を得た。

(6) LV.3-2をコードするDNAの構築

参考例3の2.(5)で得られたプラスミドpKM1334LV4-2の3 μ gに、10単位の制限酵素Tth111I（宝酒造社製）およびXmnI（ニュー・イングランド・バイオラプズ社製）を37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約2.24kbのTth111I-XmnI断片を約2 μ g回収した。

次に、参考例2の1.(3)で得られたプラスミドpKM1334LV0の3 μ gに、10単位の制限酵素Tth111IおよびXmnIを37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約1.11kbのTth111I-XmnI断片を約1 μ g回収した。

上記で得られたプラスミドpKM1334LV4-2由来のTth111I-XmnI断片0.1 μ gとプラスミドpKM1334LV0由来のTth111I-XmnI断片0.1 μ gとを全量10 μ lの滅菌水に加え、ライゲーション・ハイを用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、第28図に示したLV.3-2をコードするDNAを含むプラスミドpKM1334LV3-2を得た。

3. 抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターの構築

参考例2の2.で得られた発現ベクターpKANTEX1334HV0LV6のVLをコードするDNAを含むEcoRI-BsiWI断片を参考例3の2.で構築した各種VLをコードするDNAを含むEcoRI-BsiWI断片で置換することにより、各種VLをコードするDNAを有する抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターを構築した。具体的には、

pKANTEX1334HV0LV4-1、pKANTEX1334HV0LV4-2、pKANTEX1334HV0LV3-1、pKANTEX1334HV0LV3-2、pKANTEX1334HV0LV2-1、pKANTEX1334HV0LV2-2の6種類を構

築した。

4. 抗FGF-8中和CDR移植抗体のCHO/DG44細胞を用いた安定発現

参考例2の2. で得られた抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクター pKANTEX1334HV0LV0およびpKANTEX1334HV0LV6、参考例3の3. で得られた各種抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターを用いて各種抗FGF-8中和CDR移植抗体のCHO/DG44細胞での安定発現を上記参考例1の2. (4)に記載の方法に従い、行った。

5. 抗FGF-8中和CDR移植抗体の精製

参考例3の4項で得られた各種抗FGF-8中和CDR移植抗体を発現するCHO/DG44細胞由来の形質転換株の培養及び上清からの抗FGF-8中和CDR移植抗体の精製を上記参考例1の3. (1)に記載の方法に従い、行った。
pKANTEX1334HV0LV0を導入した形質転換株由来の抗体をHV0LV0/CHO、
pKANTEX1334HV0LV6を導入した形質転換株由来の抗体をHV0LV6/CHO、
pKANTEX1334HV0LV4-1を導入した形質転換株由来の抗体をHV0LV4-1/CHO、
pKANTEX1334HV0LV4-2を導入した形質転換株由来の抗体をHV0LV4-2/CHO、
pKANTEX1334HV0LV3-1を導入した形質転換株由来の抗体をHV0LV3-1/CHO、
pKANTEX1334HV0LV3-2を導入した形質転換株由来の抗体をHV0LV3-2/CHO、
pKANTEX1334HV0LV2-1を導入した形質転換株由来の抗体をHV0LV2-1/CHO、
pKANTEX1334HV0LV2-2を導入した形質転換株由来の抗体をHV0LV2-2/CHOと名付けた。

6. 精製した抗FGF-8中和CDR移植抗体の解析

参考例3の5. で得られた各種抗FGF-8中和CDR移植抗体のSDS-PAGEを上記参考例1の4. に記載の方法に従い、行った。その結果、いずれの抗体も正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

7. BIAcoreバイオセンサーによる、抗FGF-8中和CDR移植抗体のFGF-8に対する結合活性の測定

参考例3の5. で得られた各種抗FGF-8中和CDR移植抗体のFGF-8に対する結合活性をより詳細に検討するため、BIAcore 2000を用いて各種抗FGF-8中和CDR移植抗体のFGF-8に対する結合活性を、FGF-8の部分ペプチドである化合物1のC末端をビオチン標識したものをを用いて、以下のようにして測定、比較した。陽性対照と

して、参考例1の3.(1)で得られたCHO/DG44細胞由来の抗FGF-8中和キメラ抗体KM3034を用いた。

以下、サンプルの希釈および測定中の緩衝液としてはHBS-EPを使用した。まず、センサーチップSA(ピアコア社製)をセットし、 $5\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で $0.05\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したC末端ビオチン標識化合物1を $5\mu\text{L}$ 添加した。その後、 $5\mu\text{L}$ の $10\text{mmol}/\text{L}$ グリシン-塩酸溶液($\text{pH}1.5$)を2回連続して添加し、チップ表面を洗浄した。FGF-8ペプチドの固定化量は35RUであった。

FGF-8ペプチド固定化フローセルに $20\mu\text{L}/\text{分}$ の流速で、各種抗体溶液を $60\mu\text{L}$ 添加し、その後、3分間に渡り解離反応をモニターした。解離反応後、 $20\mu\text{L}$ の $10\text{mmol}/\text{L}$ グリシン-塩酸溶液($\text{pH}1.5$)を2回連続して添加し、チップ表面を再生させた。このサイクルを各種濃度($50\text{--}1.85\mu\text{g}/\text{mL}$)の抗体溶液について行い、各種濃度におけるセンサーグラムを得た。各々の抗体のセンサーグラムは、陰性対照としてGD3に対するキメラ抗体KM871を用いて得られたセンサーグラムを差し引くことにより特異的な反応のセンサーグラムとした。

第29図に $16.7\mu\text{g}/\text{mL}$ の各種抗体のセンサーグラムを示した。センサーグラムから明らかなように、いずれの抗体も解離反応時にほとんど解離が認められず、正確な解離速度定数を求めることが困難であった。そこで、各種抗体の結合活性の比較は、結合反応時の結合〔共鳴シグナル(RU)〕の高さを比較することにより、行った。

その結果、第29図に示したように、キメラ抗体KM3034およびHV0LV6/CHOが最も高い結合反応を示し、次いで、HV0LV3-1/CHO、HV0LV4-1/CHO、HV0LV2-1/CHOが高い結合反応を示した。一方、HV0LV3-2/CHO、HV0LV2-2/CHO、HV0LV4-2は、低い結合反応を示し、HV0LV0/CHOは、最も低い結合反応を示した。これらの結果は、参考例2の7.に記載のYB2/O細胞由来の抗FGF-8中和CDR移植抗体を用いた結果と一致していた。

8. 抗FGF-8中和CDR移植抗体のFGF-8に対する中和活性の測定

参考例3の7項においてFGF-8に対する高い結合反応が確認された4種類の抗FGF-8中和CDR移植抗体HV0LV6/CHO、HV0LV3-1/CHO、HV0LV4-1/CHO、HV0LV2-1/CHOのFGF-8中和活性の評価を参考例2の5項に記載の方法に従って、行った。陽性対照として、参考例1の3項(1)で得られたCHO/DG44細胞由来の抗FGF-8中和キメラ抗体

KM3034を、陰性対照として、W001/64754に記載のヒトケモカインCCR4に対するキメラ抗体KM2760を用いた。その結果を第30図に示した。第30図に示したように、HV0LV6/CHOは、キメラ抗体KM3034と同等のFGF-8中和活性を示し、次いで、HV0LV3-1/CHOが高いFGF-8中和活性を示した。HV0LV4-1/CHOは、HV0LV3-1/CHOに比べて若干低いFGF-8中和活性を示し、HV0LV2-1/CHOの中和活性が最も低かった。FGF-8中和活性の強さと、BIAcoreによる結合反応の強さとの間には相関が認められた。

参考例 4 より免疫原性の低い抗FGF-8中和CDR移植抗体の作製 (2)

参考例 3 の結果より、LV6の6アミノ酸残基の改変のうち、51番目の改変は活性回復に必須であることが明らかとなった。また、2番目の改変は、単独の改変では、活性回復に対する効果は小さいが51番目の改変との組合せにより、協調的に活性回復に寄与することが示唆された。14番目、15番目の改変についても、51番目の改変との組合せにより、協調的に活性回復に寄与することが示唆された。一方、50番目の改変の効果は小さいことが示唆された。そこで、2番目の改変と14番目、15番目の改変のどちらがより活性回復に対する効果が高いかを検討するため、また、92番目の改変の効果を検討するため、抗FGF-8中和CDR移植抗体の作製を再検討した。

1. VLのアミノ酸配列の再設計

以下のような改変を有する2種類のVLのアミノ酸配列を設計した。いずれもLV.0のアミノ酸残基からの改変を示した。

LV.4-3では、14番目のThr、15番目のPro、51番目のLeu、92番目のTyrの4残基をそれぞれマウス抗体KM1334に見られるアミノ酸残基であるSer、Leu、Val、Pheに改変した。

LV.3-3では、14番目のThr、15番目のPro、51番目のLeuの3残基をそれぞれマウス抗体KM1334に見られるアミノ酸残基であるSer、Leu、Valに改変した。

LV.4-3のアミノ酸配列を配列番号50に、LV.3-3のアミノ酸配列を配列番号51にそれぞれ示した。

2. VLをコードするDNAの構築

参考例 4 の 1. で設計した抗FGF-8中和CDR移植抗体の各種VLのアミノ酸配列を

コードするDNAは以下のようにして構築した。

(1) LV.4-3をコードするDNAの構築

参考例3の2.(5)に記載の方法に従い、構築した。ただし、プラスミドpKM1334LV2-2の代わりに参考例3の2.(3)で得られたプラスミドpKM1334LV2-1を用い、プラスミドpKM1334LV6の代わりに参考例3の2.(6)で得られたプラスミドpKM1334LV3-2を用いた。その結果、LV.4-3をコードするDNAを含むプラスミドpKM1334LV4-3を得た。

(2) LV.3-3をコードするDNAの構築

参考例4の2.(1)で得られたプラスミドpKM1334LV4-3の3 μ gを10単位の制限酵素BamHI(宝酒造社製)及び10単位の制限酵素SpeIを用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約3.23kbのBamHI-SpeI断片を約2.5 μ g回収した。

次に、参考例2の1.(3)で得られたプラスミドpKM1334LV0の3 μ gを10単位の制限酵素BamHI及び10単位の制限酵素SpeIを用いて37°Cで1時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.13kbのBamHI-SpeI断片を約0.15 μ g回収した。

上記で得られたプラスミドpKM1334LV4-3由来のBamHI-SpeI断片0.1 μ gとプラスミドpKM1334LV0由来のBamHI-SpeI断片0.1 μ gを全量10 μ lの滅菌水に加え、ライゲーション・ハイを用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、第31図に示したLV.3-3をコードするDNAを含むプラスミドpKM1334LV3-3を得た。

3. 抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターの構築

参考例2の2.で得られた発現ベクターpKANTEX1334HV0LV6のVLをコードするDNAを含むEcoRI-BsiWI断片を参考例4の2.で構築した各種VLをコードするDNAを含むEcoRI-BsiWI断片で置換することにより、各種VLをコードするDNAを有する抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターを構築した。具体的には、pKANTEX1334HV0LV4-3、pKANTEX1334HV0LV3-3の2種類を構築した。

4. 抗FGF-8中和CDR移植抗体のCHO/DG44細胞を用いた安定発現

参考例4の3.で得られた各種抗FGF-8中和CDR移植抗体発現ベクターを用いて各種抗FGF-8中和CDR移植抗体のCHO/DG44細胞での安定発現を上記参考例1の2.

(4) に記載の方法に従い、行った。

5. 抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の精製

参考例 4 の 4. で得られた各種抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体を発現する CHO/DG44 細胞由来の形質転換株の培養及び上清からの抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の精製を上記参考例 1 の 3. (1) に記載の方法に従い、行った。pKANTEX1334HV0LV4-3 を導入した形質転換株由来の抗体を HV0LV4-3/CHO、pKANTEX1334HV0LV3-3 を導入した形質転換株由来の抗体を HV0LV3-3/CHO と名付けた。

6. 精製した抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の解析

参考例 4 の 5. で得られた各種抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の SDS-PAGE を上記参考例 1 の 4. に記載の方法に従い、行った。その結果、いずれの抗体も正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

7. 抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の FGF-8 に対する結合活性の測定

参考例 3 の 5. で得られた抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体 HV0LV6/CHO および HV0LV3-1/CHO、参考例 4 の 5. で得られた抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体 HV0LV4-3/CHO および HV0LV3-3/CHO の FGF-8 に対する結合活性を参考例 3 の 7. に記載の方法に従い、測定した。陽性対照として、参考例 1 の 3. (1) で得られた CHO/DG44 細胞由来の抗 FGF-8 中和キメラ抗体 KM3034 を用いた。

第32図に16.7 μ g/mLの各種抗体のセンサーグラムを示した。センサーグラムから明らかなように、いずれの抗体も解離反応時にほとんど解離が認められず、正確な解離速度定数を求めることが困難であった。そこで、各種抗体の結合活性の比較は、結合反応時の結合〔共鳴シグナル (RU) 〕の高さを比較することにより、行った。その結果、第32図に示したように、キメラ抗体KM3034が最も高い結合反応を示し、HV0LV4-3/CHOは、HV0LV3-1/CHOよりも高く、HV0LV6/CHOと同等の結合反応を示した。HV0LV3-3/CHOの結合反応は、HV0LV3-1よりも低かった。以上の結果より、結合反応の高さに関しては、2番目の改変よりも、14番目、15番目の改変の方がより協調的に働くこと、また、92番目の改変は、活性の回復に必須であることが示唆された。

8. 抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体の FGF-8 に対する中和活性の測定

参考例 3 の 5. で得られた抗 FGF-8 中和 CDR 移植抗体 HV0LV6/CHO および HV0LV3-

1/CHO、参考例 4 の 5 . で得られた抗FGF-8中和CDR移植抗体HV0LV4-3/CHOおよびHV0LV3-3/CHOのFGF-8中和活性の評価を参考例 2 の 5 . に記載の方法に従って、行った。陽性対照として、参考例 1 の 3 . (1) で得られたCHO/DG44細胞由来の抗FGF-8中和キメラ抗体KM3034を、陰性対照として、W001/64754に記載のヒトケモカインCCR4に対するキメラ抗体KM2760を用いた。その結果を第33図に示した。第33図に示したように、HV0LV6/CHOおよびHV0LV3-1/CHOは、キメラ抗体KM3034と同等のFGF-8中和活性を示した。一方、HV0LV4-3/CHOおよびHV0LV3-3/CHOは、同等の中和活性を示し、その活性はキメラ抗体KM3034に比べて1/2程度であった。HV0LV3-1/CHOとHV0LV4-3/CHOの中和活性は、BIAcoreでの結合反応の高さと相関せず、2番目のアミノ酸残基と14番目、15番目のアミノ酸残基は、FGF-8に対する結合活性と細胞に対するFGF-8中和活性において独立した影響を与えることが示唆された。

以上の各種評価結果より、キメラ抗体KM3034と同等の高い結合反応およびFGF-8中和活性を示したCHO/DG44細胞由来のCDR移植抗体HV0LV6/CHOをKM8034と命名し、また、KM8034を高発現するCHO/DG44細胞由来の形質転換細胞クローンも同様にKM8034と命名した。また、KM8034と同等の高い結合反応を示したCHO/DG44細胞由来のCDR移植抗体HV0LV4-3/CHOをKM8035と命名し、また、KM8035を高発現するCHO/DG44細胞由来の形質転換細胞株も同様にKM8035と命名した。KM8035のVLのアミノ酸配列LV.4-3を配列番号38に示した。なお、形質転換細胞株KM8035は平成14年6月20日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1-1中央第6）にFERM BP-8082として寄託されている。また、KM8034と同等の高いFGF-8中和活性を示したCHO/DG44細胞由来のCDR移植抗体HV0LV3-1/CHOをKM8036と命名し、また、KM8036を高発現するCHO/DG44細胞由来の形質転換細胞株も同様にKM8036と命名した。KM8036のVLのアミノ酸配列LV.3-1を配列番号39に示した。なお、形質転換細胞株KM8036は平成14年6月20日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1-1中央第6）にFERM BP-8083として寄託されている。

抗FGF-8中和CDR移植抗体KM8034は、キメラ抗体KM3034と同等の高い結合反応およびFGF-8中和活性を示し、かつ、ヒトにおける免疫原性がキメラ抗体よりも低下することから、キメラ抗体よりも高い治療効果が期待される。抗FGF-8中和CDR移

植抗体KM8036およびKM8035では、KM8034に比べて、結合活性およびFGF-8中和活性が若干低下する可能性があるが、それぞれマウス抗体KM1334に由来するV領域FRのアミノ酸残基が3残基および4残基となることから、KM8034よりもさらに免疫原性が低下することが期待される。

産業上の利用可能性

本発明により、抗FGF-8中和抗体を有効成分として含有する、関節炎の予防薬または治療薬、軟骨保護剤、関節破壊抑制剤、滑膜増殖抑制剤、および抗FGF-8抗体を有効成分として含有する関節炎の診断薬ならびに該抗体を用いた関節炎の判定方法が提供される。

「配列表フリーテキスト」

配列番号13-KM1334のVHの増幅のためのプライマー

配列番号14-KM1334のVHの増幅のためのプライマー

配列番号15-KM1334のVLの増幅のためのプライマー

配列番号16-KM1334のVHの増幅のためのプライマー

配列番号17-C末にシステイン残基を付加したヒトFGF-8のペプチド（23～46番目のアミノ酸残基）

配列番号18-設計された抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列、HV.0

配列番号19-設計された抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列、LV.0

配列番号20-設計された抗FGF-8中和CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列、HV.6

配列番号21-設計された抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列、LV.6

配列番号22-HV.0をコードするDNA

配列番号23-HV.0をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号24-HV.0をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号25-HV.0をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号26-HV.0をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号27-HV.6をコードするDNA

配列番号28-HV.6をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号29-HV.6をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号30—HV.6をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号31—HV.6をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号32—LV.0をコードするDNA

配列番号33—LV.0をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号34—LV.0をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号35—LV.0をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号36—LV.0をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号37—LV.6をコードするDNA

配列番号38—LV.6をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号39—LV.6をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号40—LV.6をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号41—LV.6をコードするDNAの構築のための合成DNA

配列番号42—設計された抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列、LV.4-1

配列番号43—設計された抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列、LV.4-2

配列番号44—設計された抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列、LV.3-1

配列番号45—設計された抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列、LV.3-2

配列番号46—設計された抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列、LV.2-1

配列番号47—設計された抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列、LV.2-2

配列番号48—LV.3-1をコードするDNAの構築のためのプライマー

配列番号49—LV.2-2をコードするDNAの構築のためのプライマー

配列番号50—設計された抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列、LV.4-3

配列番号51—設計された抗FGF-8中和CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列、LV.3-3

請求の範囲

1. FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する関節炎の予防薬または治療薬。
2. FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1記載の医薬。
3. モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である請求項2記載の医薬。
4. ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451) である請求項3記載の医薬。
5. ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型相補性決定領域 (CDR) 移植抗体である請求項3記載の医薬。
6. ヒト型キメラ抗体が、FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害するモノクローナル抗体の抗体重鎖可変領域 (VH) および抗体軽鎖可変領域 (VL)、ならびにヒト抗体の抗体重鎖定常領域 (CH) および抗体軽鎖定常領域 (CL) からなるヒト型キメラ抗体である請求項5記載の医薬。
7. ヒト型キメラ抗体が、以下の (a) ~ (c) のいずれかのヒト型キメラ抗体である請求項6記載の医薬。
 - (a) VHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体
 - (b) VLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体
 - (c) VHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体
8. ヒト型キメラ抗体が、形質転換体KM3034 (FERM BP-7836) が生産するヒト型キメラ抗体である請求項7記載の医薬。
9. ヒト型CDR移植抗体が、FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRならびにヒト抗体のCHおよびCLを含むヒト型CDR移植抗体である請求項5記載の医薬。
10. ヒト型CDR移植抗体が、FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDR、ヒト抗体のVHおよびVLのフレームワーク領域 (FR)、ならびにヒト抗体のCHおよびCLからなるヒト型CDR移植抗体である請求項9記載の医薬。

11. ヒト型CDR移植抗体が、以下の（a）～（c）のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項9または10記載の医薬。

（a）VHのCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号7、8および9で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

（b）VLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

（c）VHのCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号7、8および9で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

12. ヒト型CDR移植抗体が、以下の（a）～（c）のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項9または10記載の医薬。

（a）VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

（b）VLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

（c）VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

13. ヒト型CDR移植抗体が、以下の（a）～（c）のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項9または10記載の医薬。

(a) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列配列を含むヒト型CDR移植抗体

14. ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項13記載の医薬。

(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号21で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号44で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号50で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

15. ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項9または10記載の医薬。

(a) 形質転換体KM8037 (FERM BP-8084) が生産するヒト型CDR移植抗体

(b) 形質転換体KM8035 (FERM BP-8082) が生産するヒト型CDR移植抗体

(c) 形質転換体KM8036 (FERM BP-8083) が生産するヒト型CDR移植抗体

16. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、1本鎖抗体(scFv)、2量体化可変領域(V領域)断片(diabody)、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項3記載の医薬。

17. FGF-8に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する関節炎の診断薬。

18. FGF-8に特異的に結合する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項17記載の診断薬。

19. モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である請求項18記載の診断薬。

20. ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451) である請求項19記載の診断薬。

21. ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である請求項19

記載の診断薬。

22. ヒト型キメラ抗体が、FGF-8に特異的に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVL、ならびにヒト抗体のCHおよびCLからなるヒト型キメラ抗体である請求項21記載の診断薬。

23. ヒト型キメラ抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型キメラ抗体である請求項22記載の診断薬。

(a) VHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(b) VLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(c) VHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

24. ヒト型キメラ抗体が形質転換体KM3034 (FERM BP-7836) が生産するヒト型キメラ抗体である請求項23記載の診断薬。

25. ヒト型CDR移植抗体が、FGF-8に特異的に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRならびにヒト抗体のCHおよびCLを含むヒト型CDR移植抗体である請求項21記載の診断薬。

26. ヒト型CDR移植抗体が、FGF-8に特異的に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDR、ヒト抗体のVHおよびVLのFR、ならびにヒト抗体のCHおよびCLからなるヒト型CDR移植抗体である請求項25記載の診断薬。

27. ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項25または26記載の診断薬。

(a) VHのCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号7、8および9で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHのCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号7、8および9で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

28. ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項25または26記載の診断薬。

(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目の

Lys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

29. ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項25または26記載の診断薬。

(a) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列配列を含むヒト型CDR移植抗体

30. ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項29記載の診断薬。

(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号21で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号44で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号50で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

31. ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項25または26記載の診断薬。

(a) 形質転換体KM8037 (FERM BP-8084) が生産するヒト型CDR移植抗体

(b) 形質転換体KM8035 (FERM BP-8082) が生産するヒト型CDR移植抗体

(c) 形質転換体KM8036 (FERM BP-8083) が生産するヒト型CDR移植抗体

32. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、1本鎖抗体(scFv)、2量体化V領域断片(diabody)、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv) およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項19記載の診断薬。

33. FGF-8に特異的に結合する抗体を用いて試料中のFGF-8を検出および/または定量することを特徴とする関節炎の判定方法。

34. FGF-8に特異的に結合する抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項33記載の判定方法。

35. モノクローナル抗体が、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片から選ばれる抗体である請求項34記載の判定方法。

36. ハイブリドーマが、ハイブリドーマKM1334 (FERM BP-5451) である請求項35記載の判定方法。

37. ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である請求項35記載の判定方法。

38. ヒト型キメラ抗体が、FGF-8に特異的に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVL、ならびにヒト抗体のCHおよびCLからなるヒト型キメラ抗体である請求項37記載の判定方法。

39. ヒト型キメラ抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型キメラ抗体である請求項38記載の判定方法。

(a) VHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(b) VLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

(c) VHが配列番号5で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体

40. ヒト型キメラ抗体が形質転換体KM3034 (FERM BP-7836) が生産するヒト型

キメラ抗体である請求項39記載の判定方法。

41. ヒト型CDR移植抗体が、FGF-8に特異的に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRならびにヒト抗体のCHおよびCLを含むヒト型CDR移植抗体である請求項37記載の判定方法。

42. ヒト型CDR移植抗体が、FGF-8に特異的に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDR、ヒト抗体のVHおよびVLのFR、ならびにヒト抗体のCHおよびCLからなるヒト型CDR移植抗体である請求項41記載の判定方法。

43. ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項41または42記載の判定方法。

(a) VHのCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号7、8および9で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHのCDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ配列番号7、8および9で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号10、11および12で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

44. ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項41または42記載の判定方法。

(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列のうち、12番目のLys、13番目のLys、40番目のAla、41番目のPro、48番目のMet、68番目のVal、70番目のIle、74番目のThr、76番目のThr、82番目のGlu、84番目のSer、87番目のArgおよび95番目

のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19で示されるアミノ酸配列のうち、2番目のIle、3番目のVal、14番目のThr、15番目のPro、50番目のGln、51番目のLeuおよび92番目のTyrから選ばれる少なくとも1つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

45. ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項41または42記載の判定方法。

(a) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18または20で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号19、21、42、43、44、45、46、47、50または51で示されるアミノ酸配列配列を含むヒト型CDR移植抗体

46. ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項45記載の判定方法。

(a) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号21で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(b) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号44で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

(c) VHが配列番号18で示されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号50で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体

47. ヒト型CDR移植抗体が、以下の(a)～(c)のいずれかのヒト型CDR移植抗体である請求項41または42記載の判定方法。

(a) 形質転換体KM8037 (FERM BP-8084) が生産するヒト型CDR移植抗体

(b) 形質転換体KM8035 (FERM BP-8082) が生産するヒト型CDR移植抗体

(c) 形質転換体KM8036 (FERM BP-8083) が生産するヒト型CDR移植抗体

48. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、1本鎖抗体(scFv)、2量体化V領域断片(diabody)、ジスルフィド安定化V領域断片(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項35記載の判定方法。

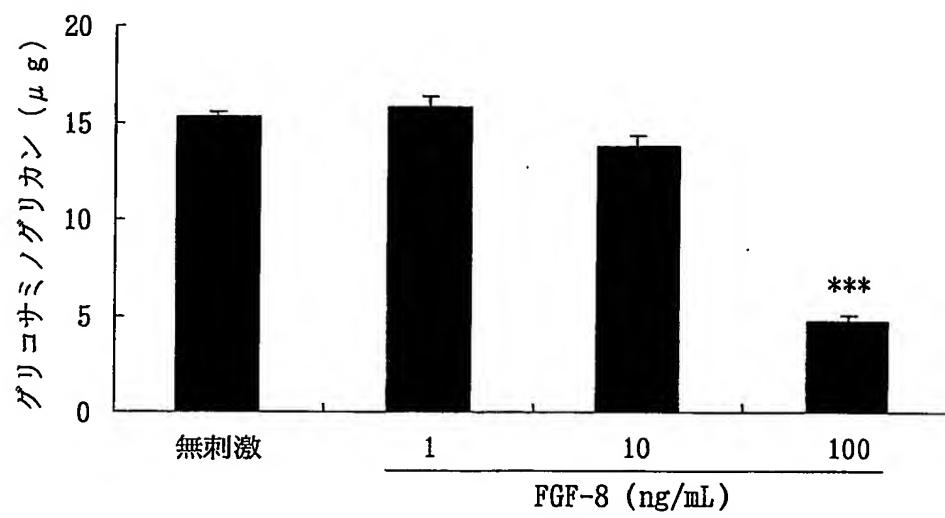
49. FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含

有する関節破壊抑制剤。

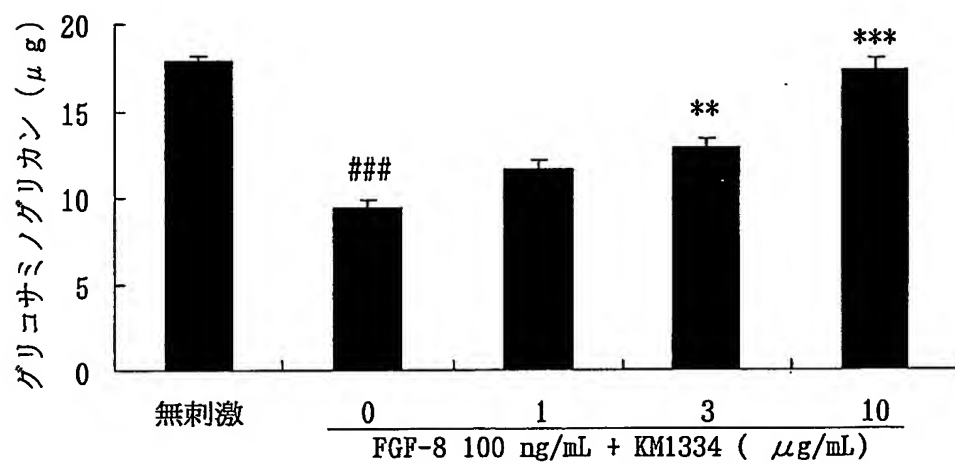
50. FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する軟骨保護剤。

51. FGF-8に特異的に結合し、FGF-8の活性を阻害する抗体を有効成分として含有する滑膜増殖抑制剤。

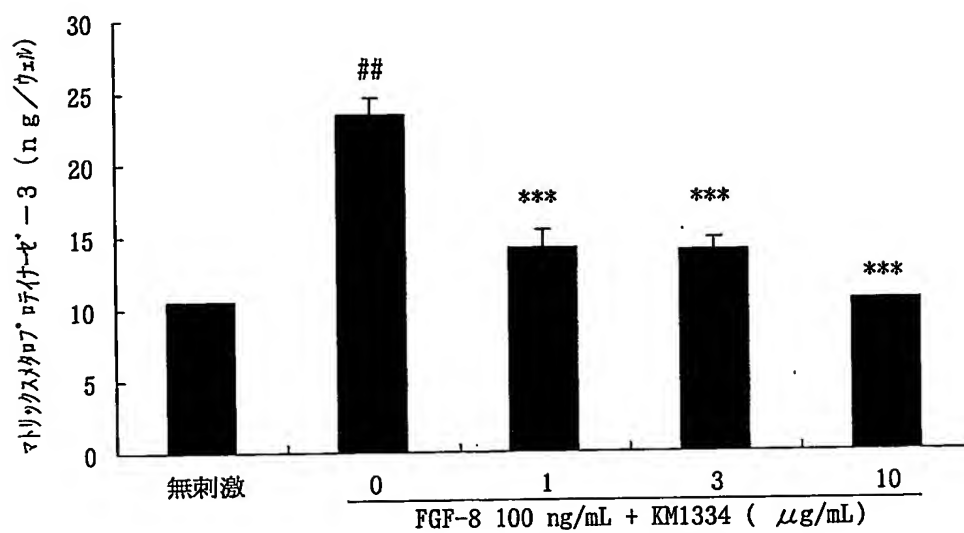
第1図



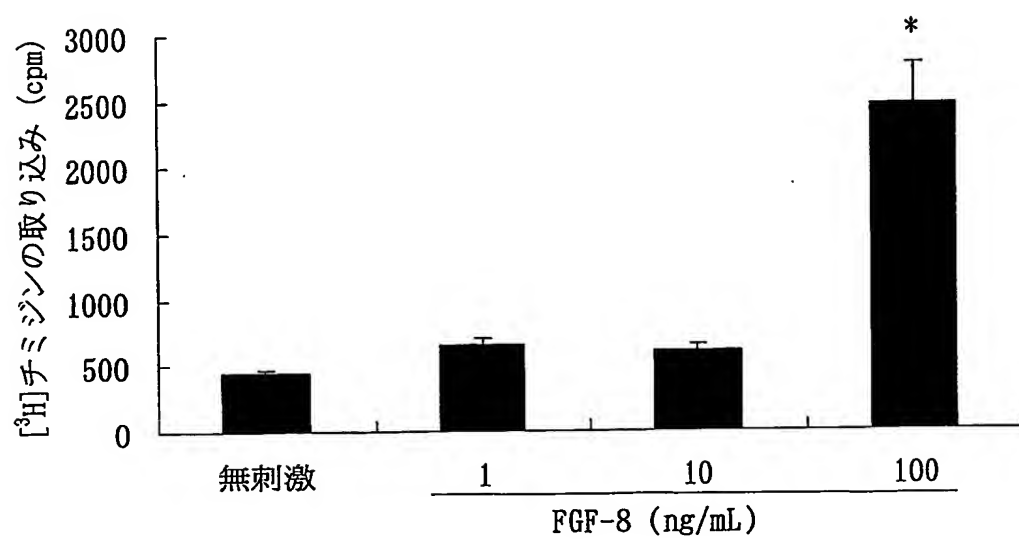
第2図



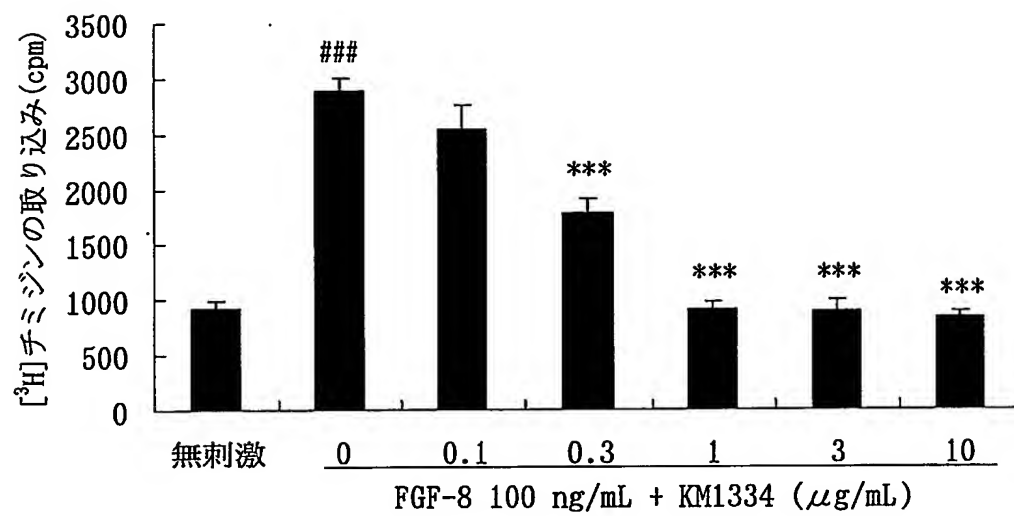
第3図



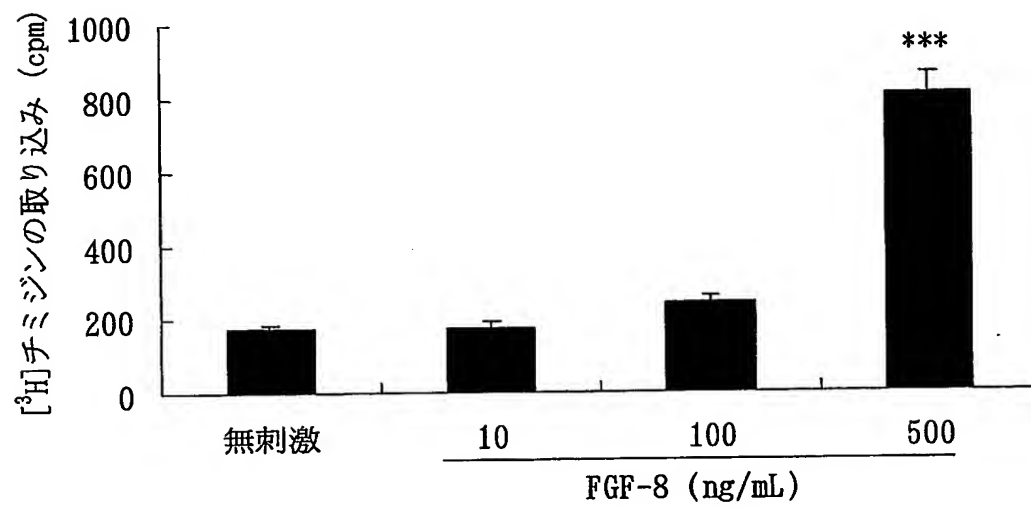
第4図



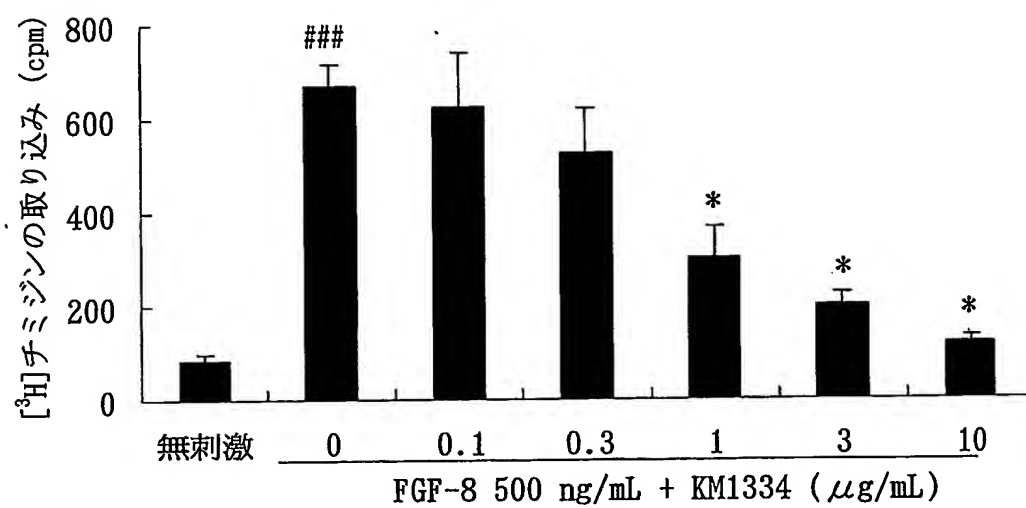
第5図



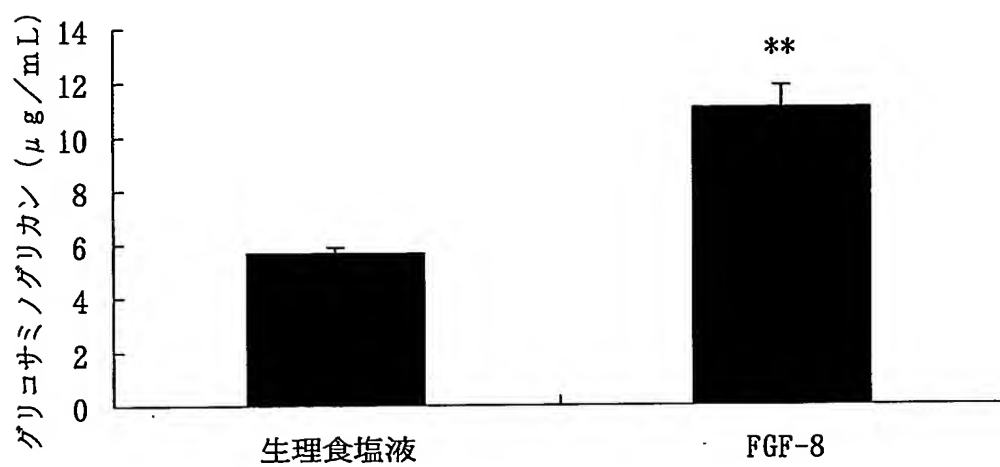
第6図



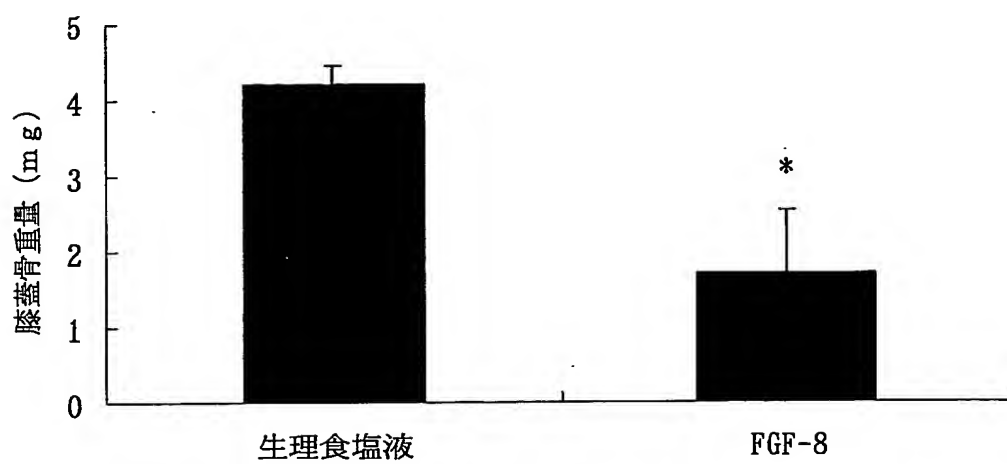
第7図



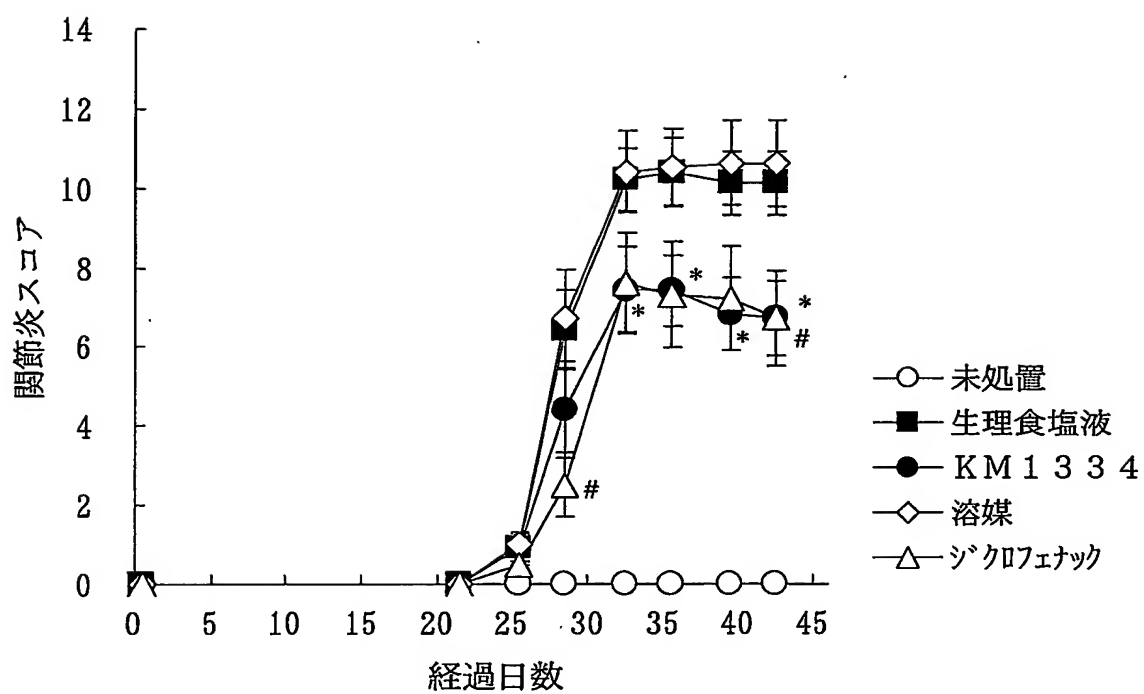
第8図



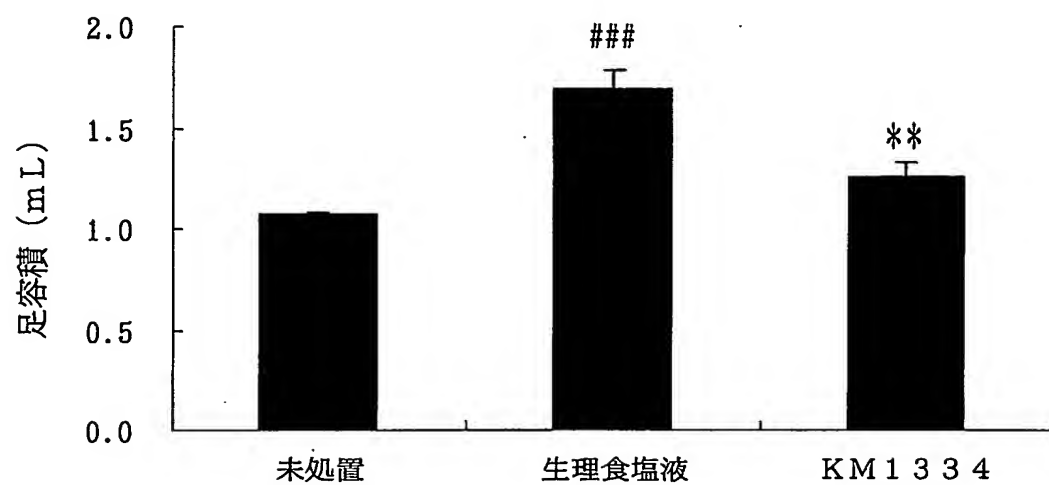
第9図



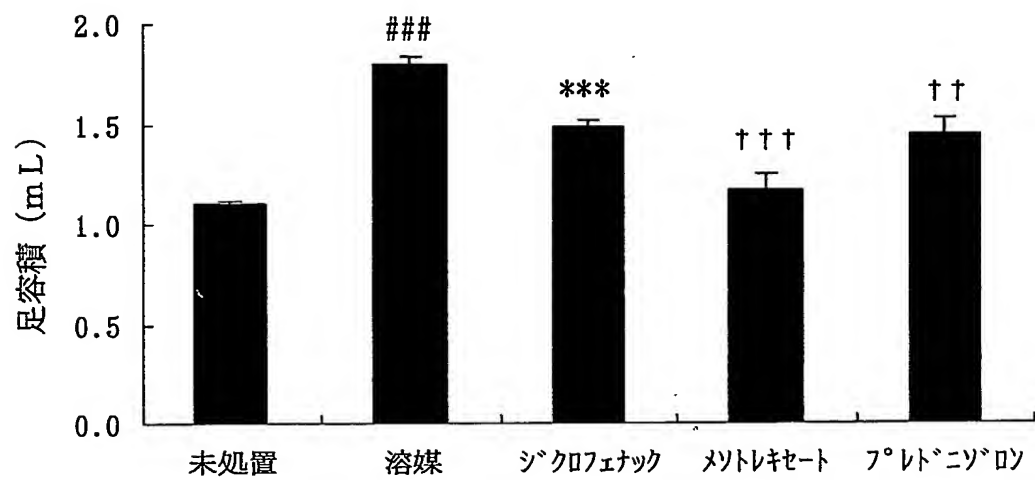
第10図



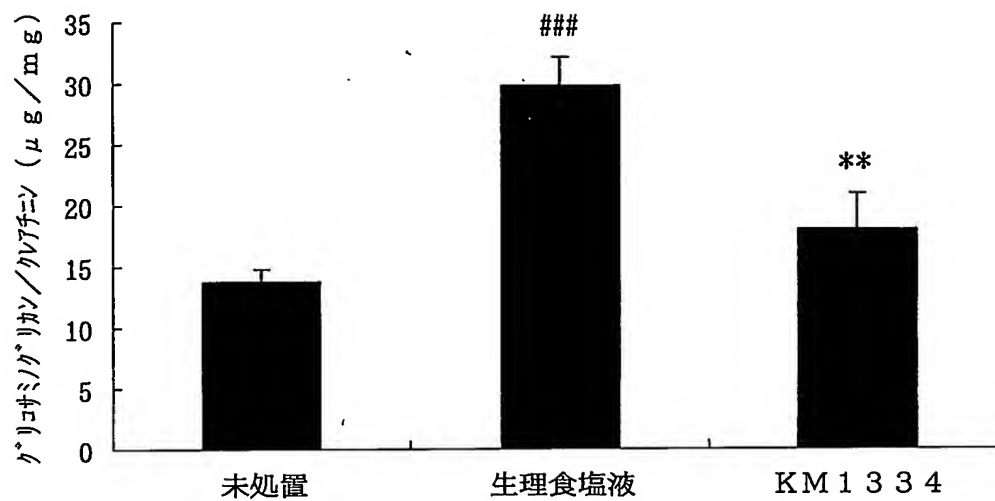
第11図



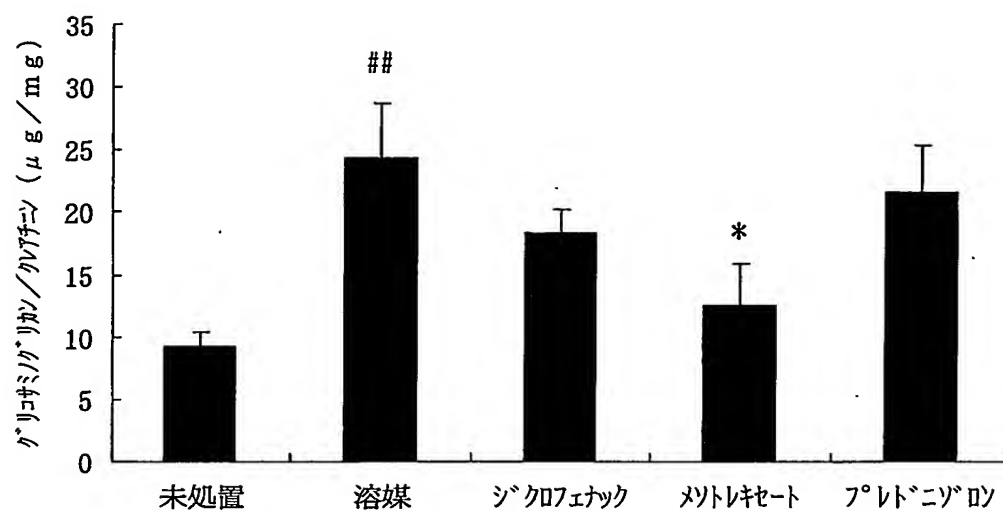
第12図



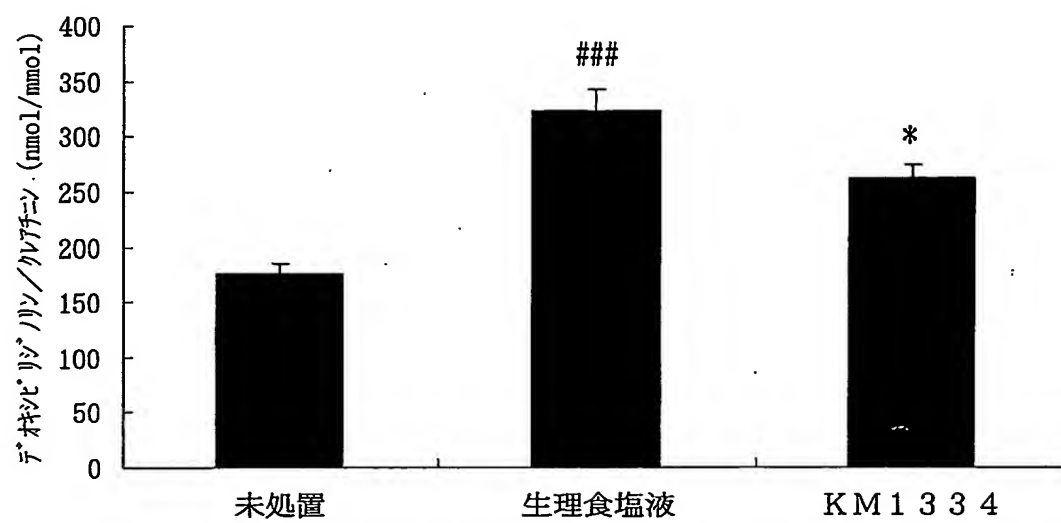
第13図



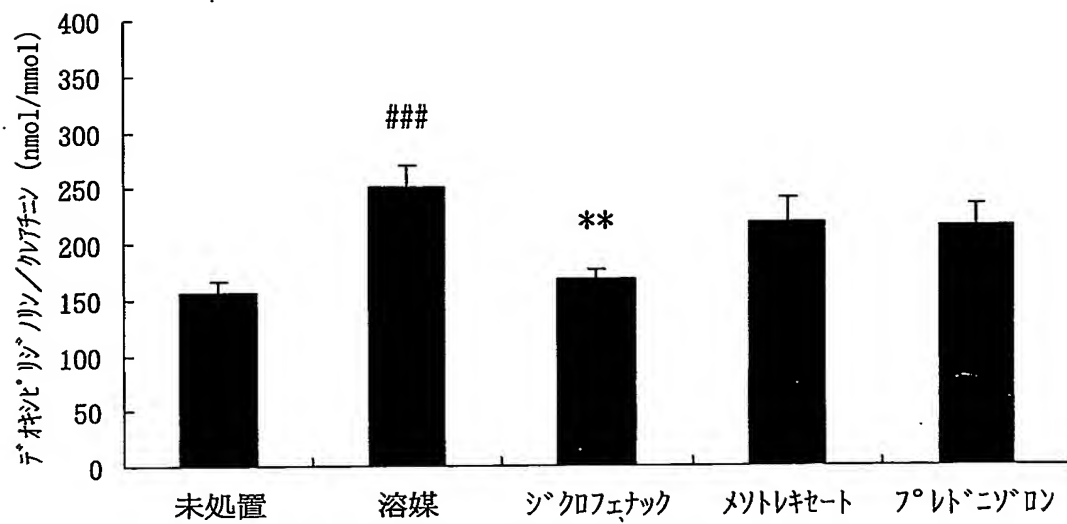
第14図



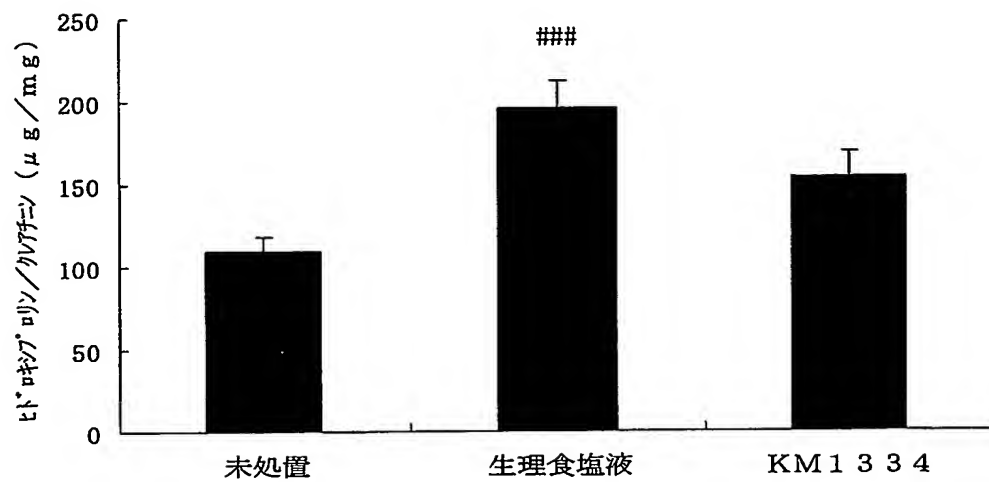
第15図



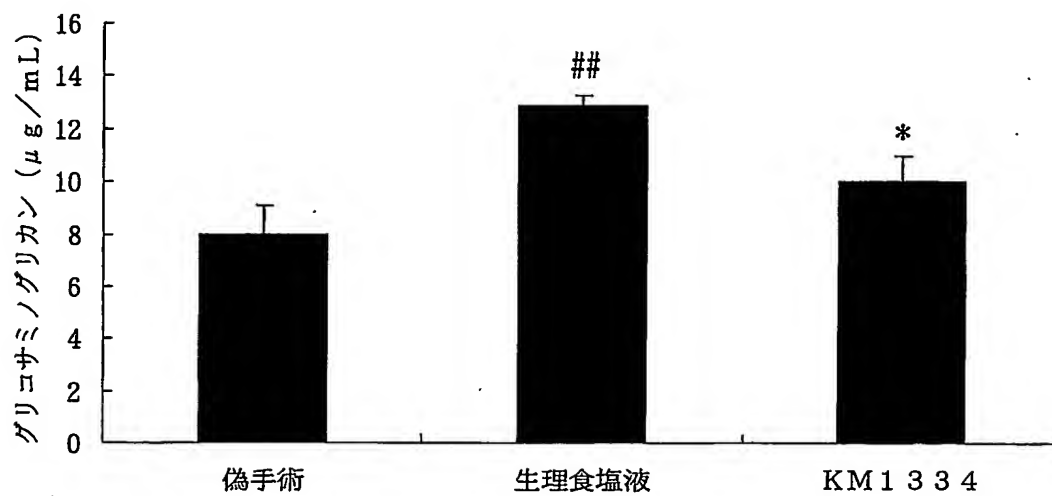
第16図



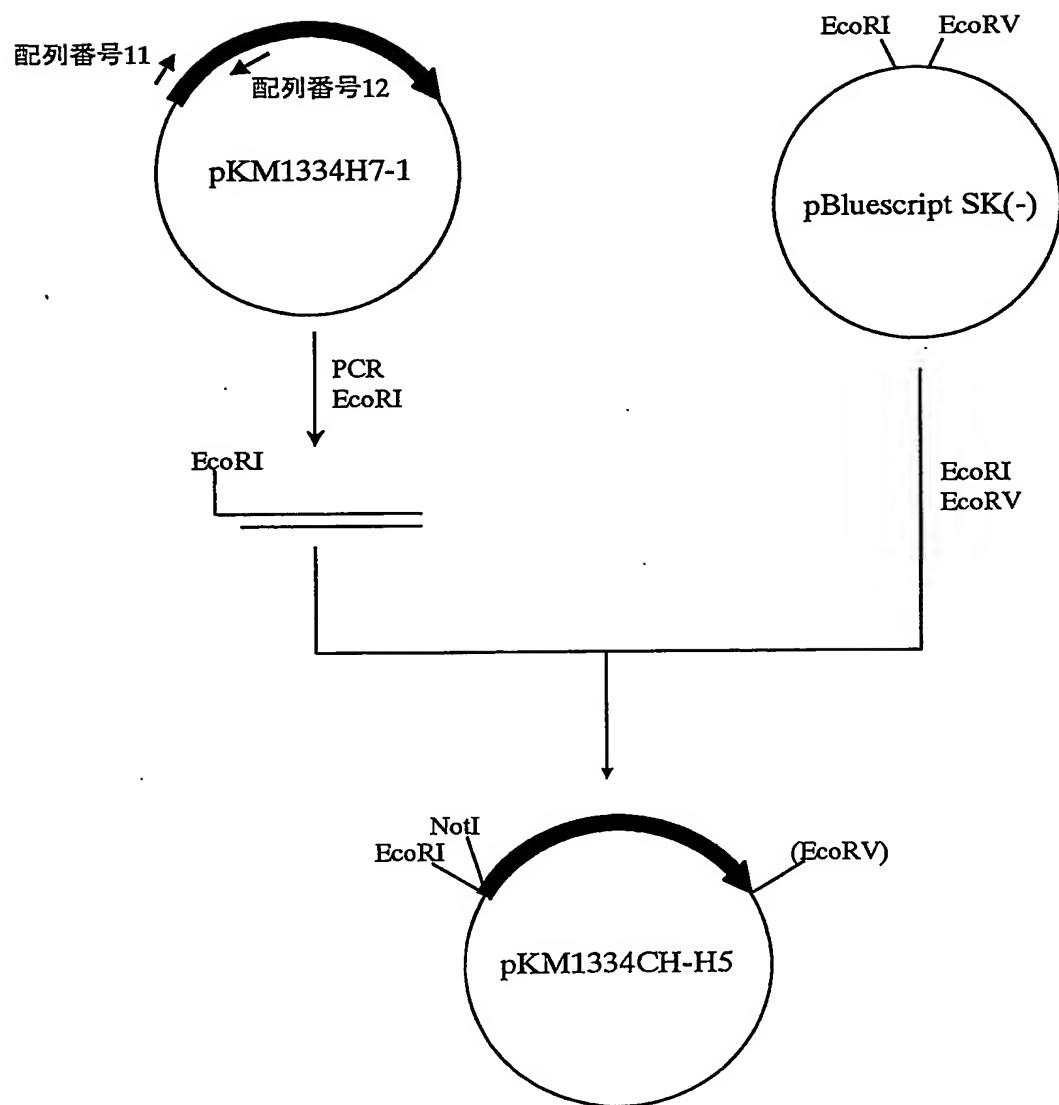
第17図



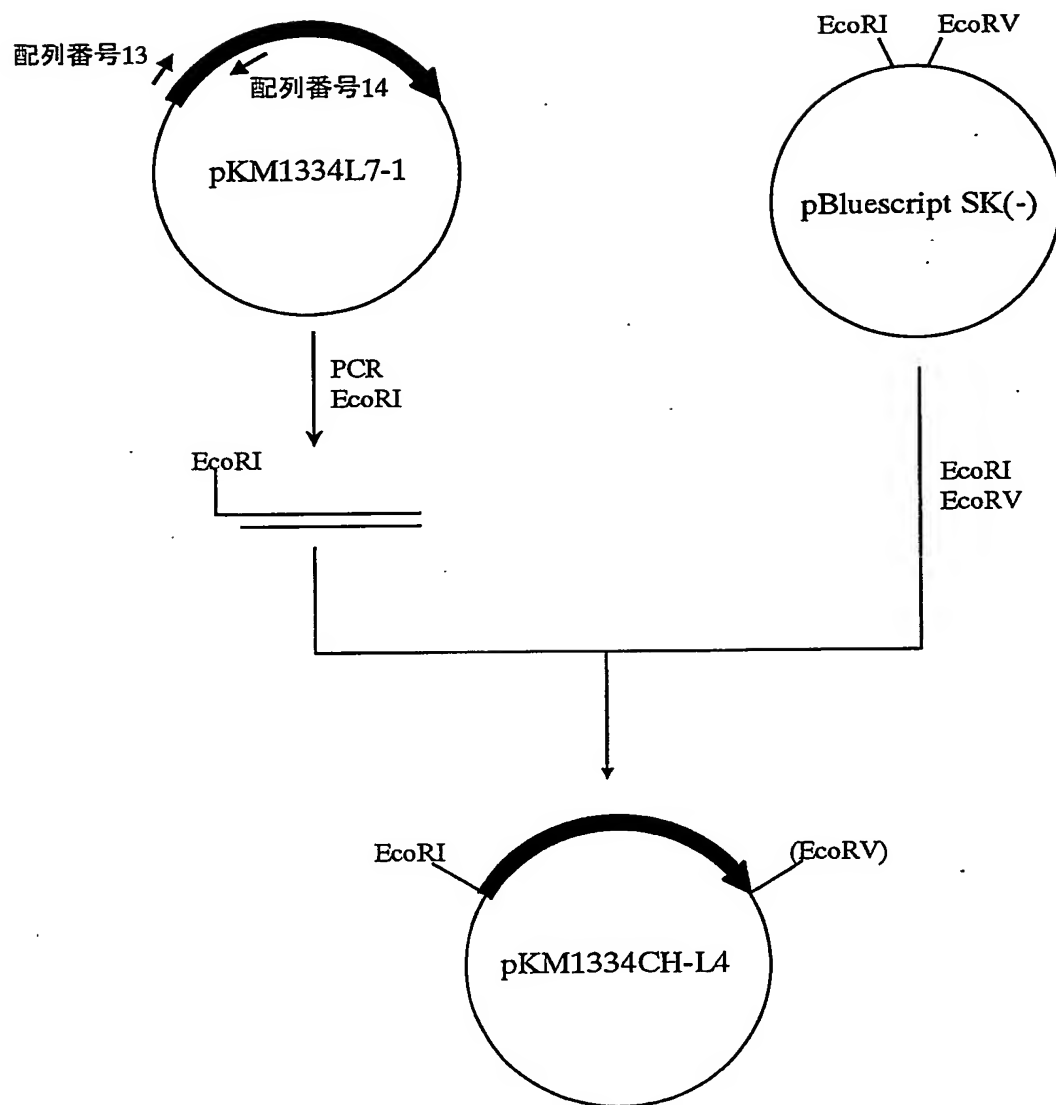
第18図

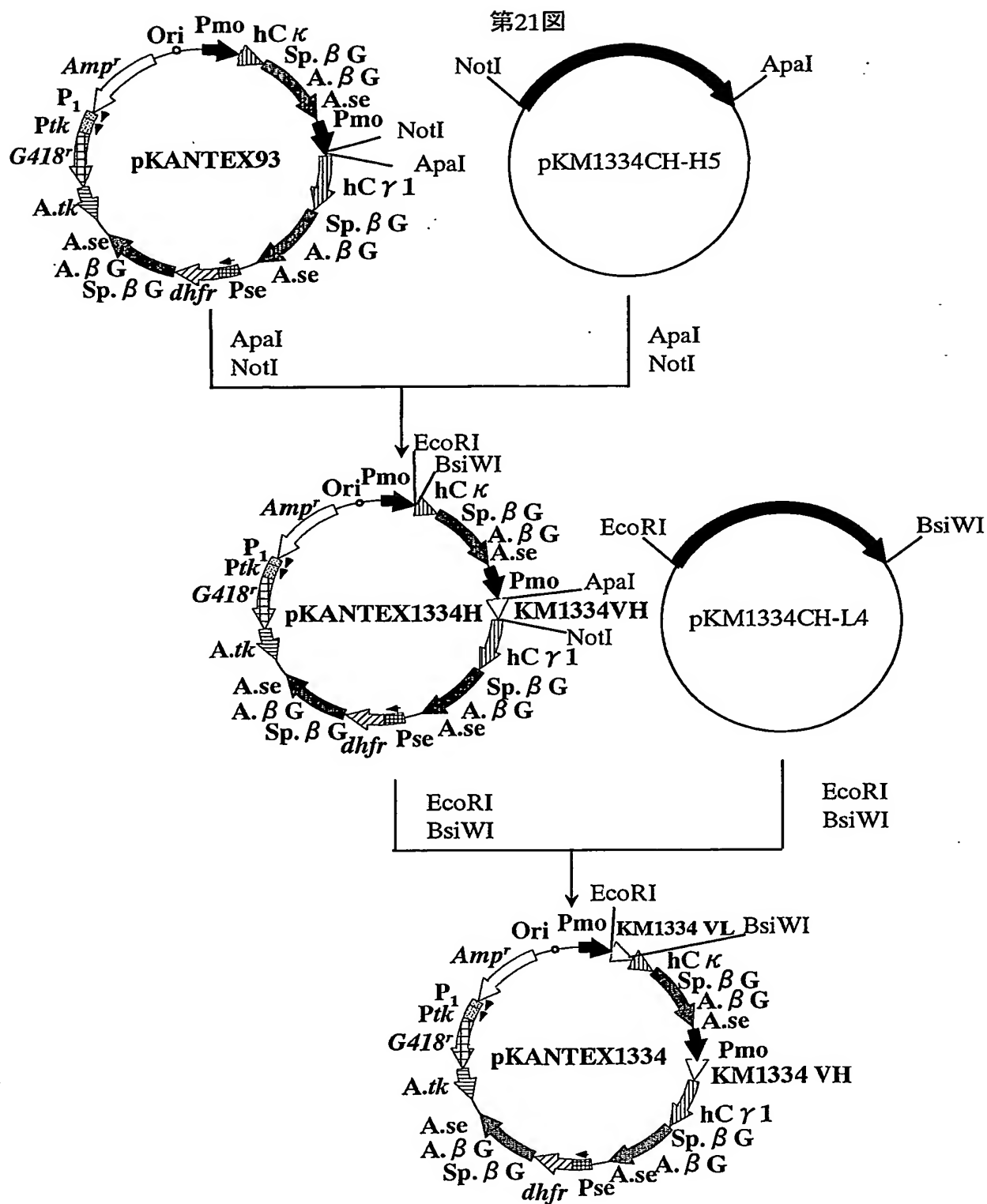


第19図

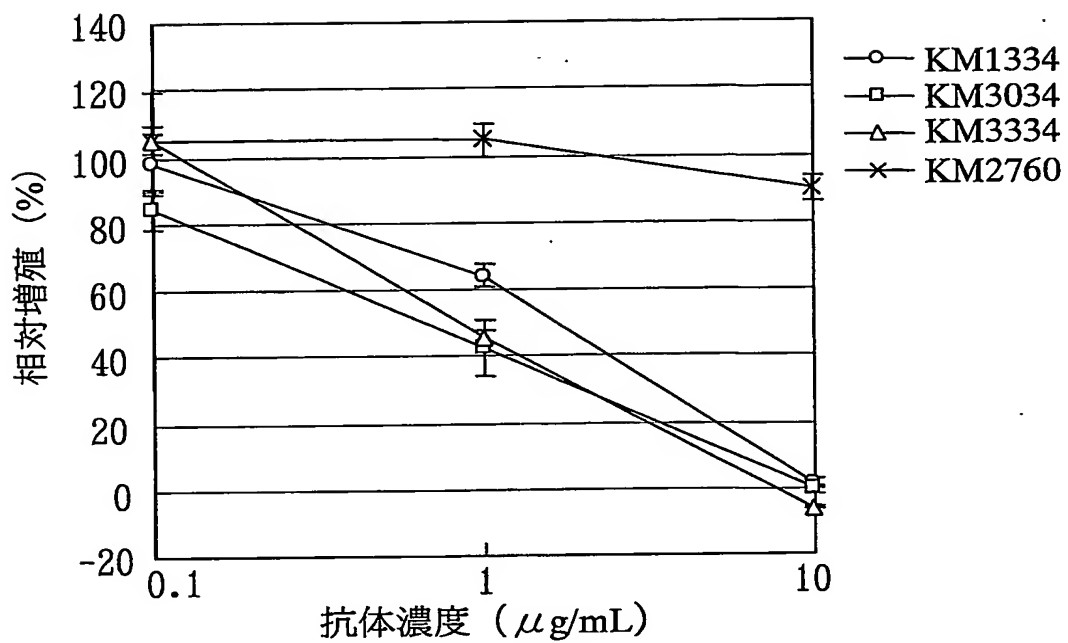


第20図

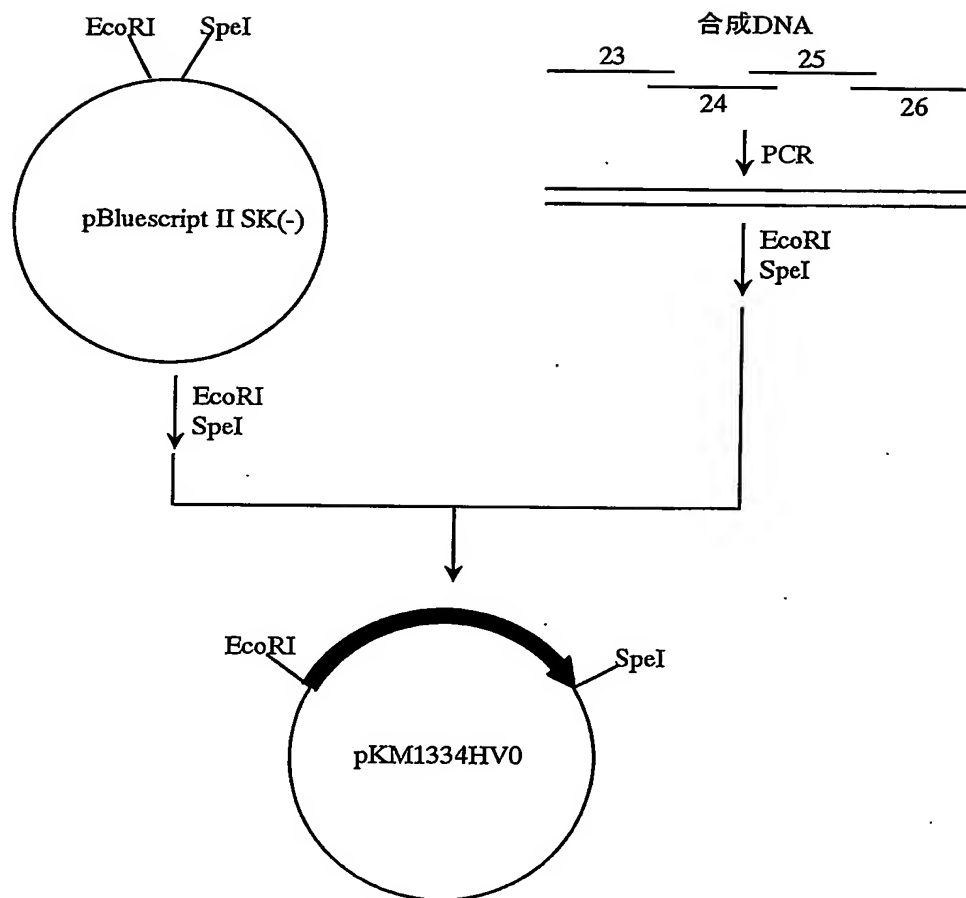




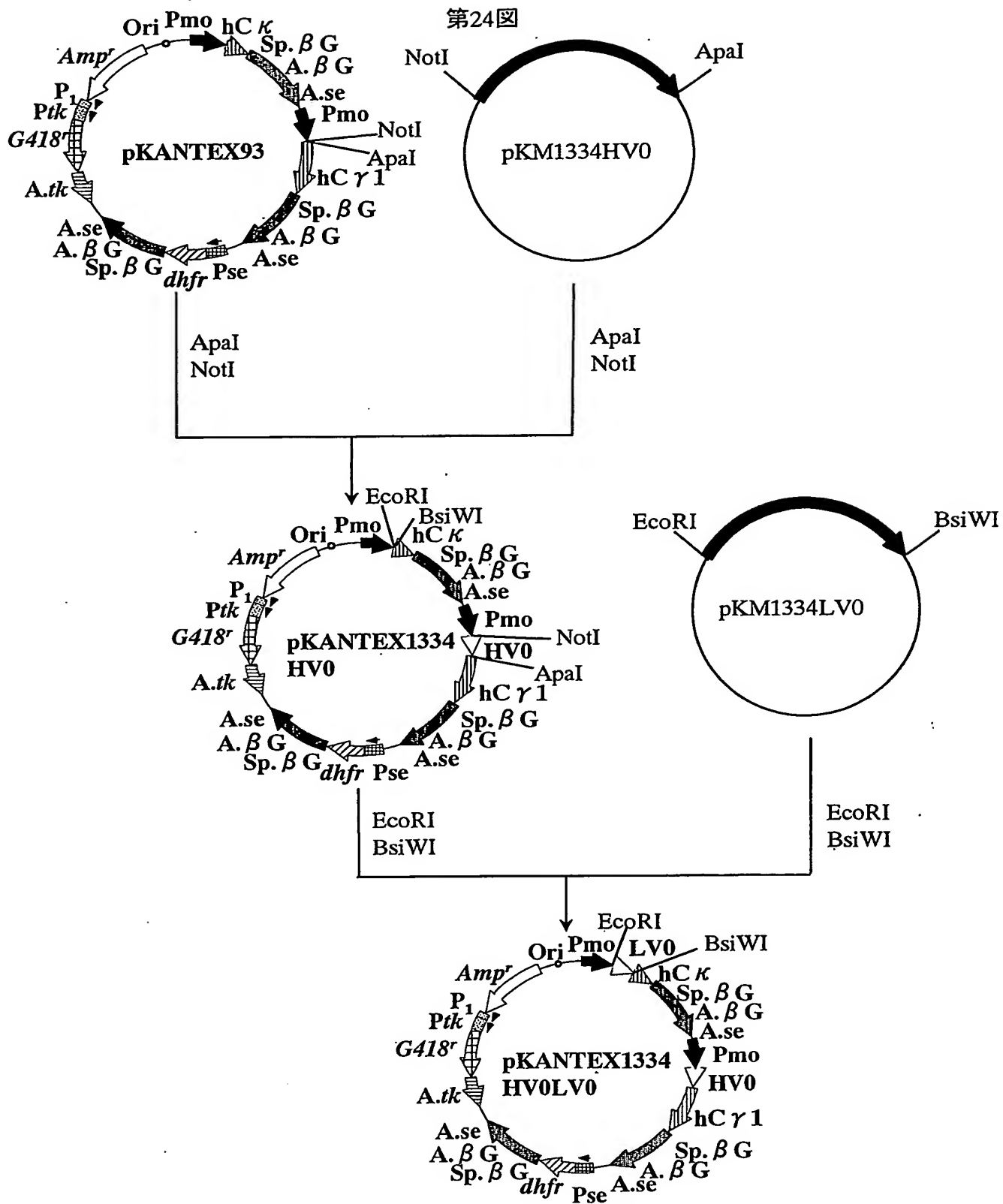
第22図



第23図

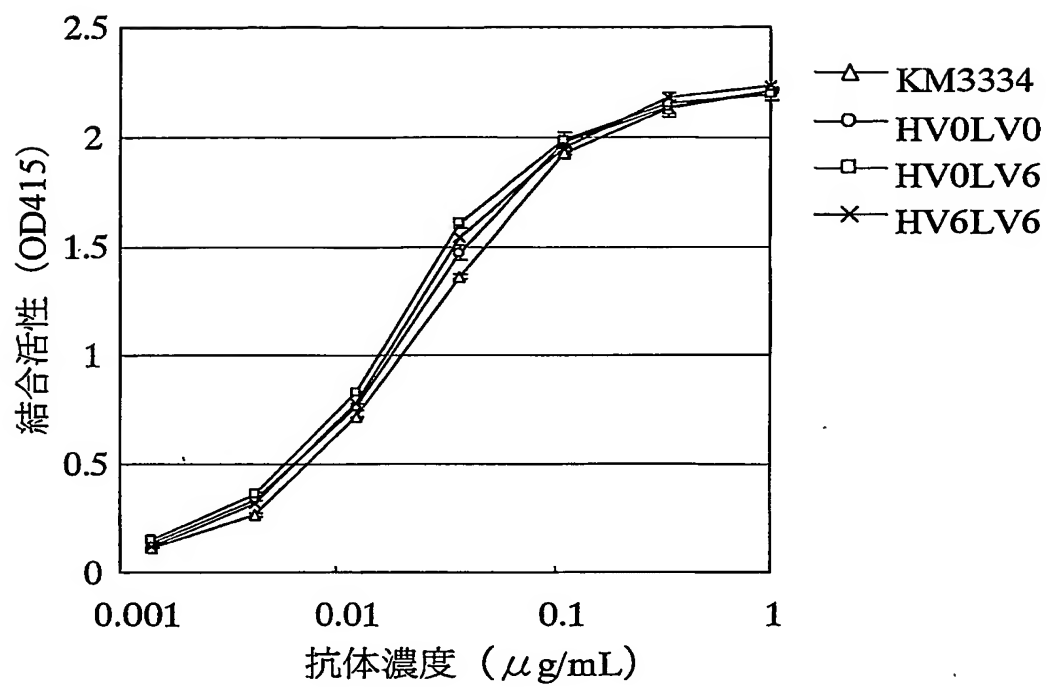


第24図

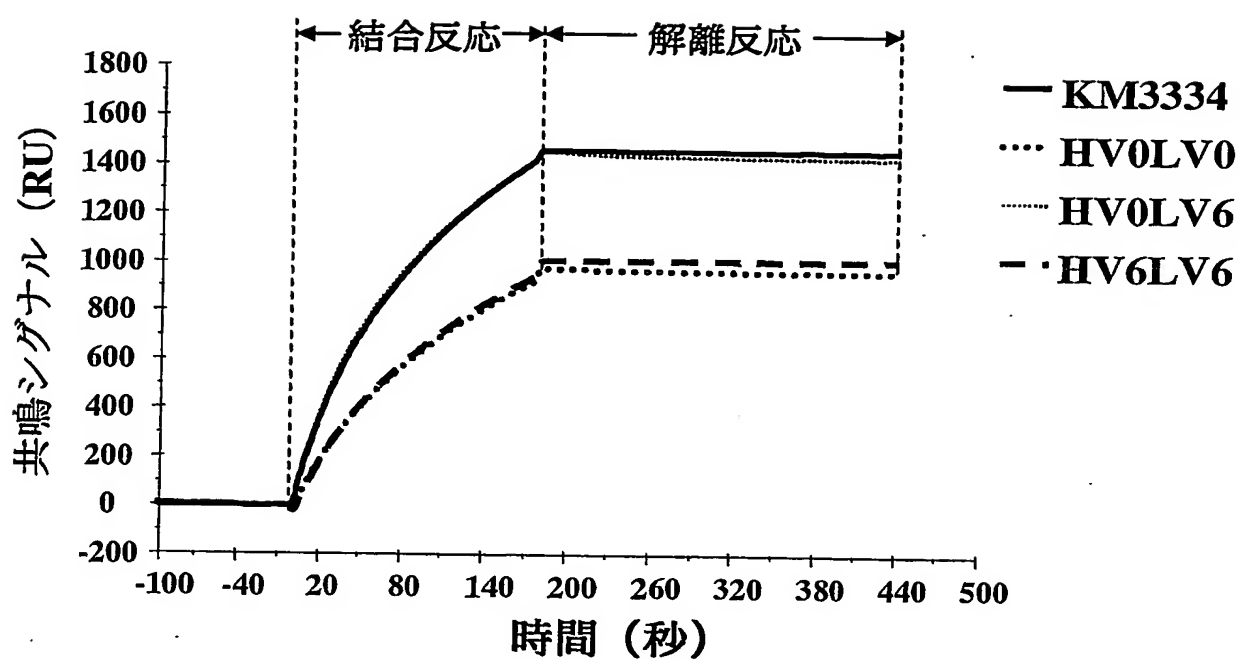


24/34

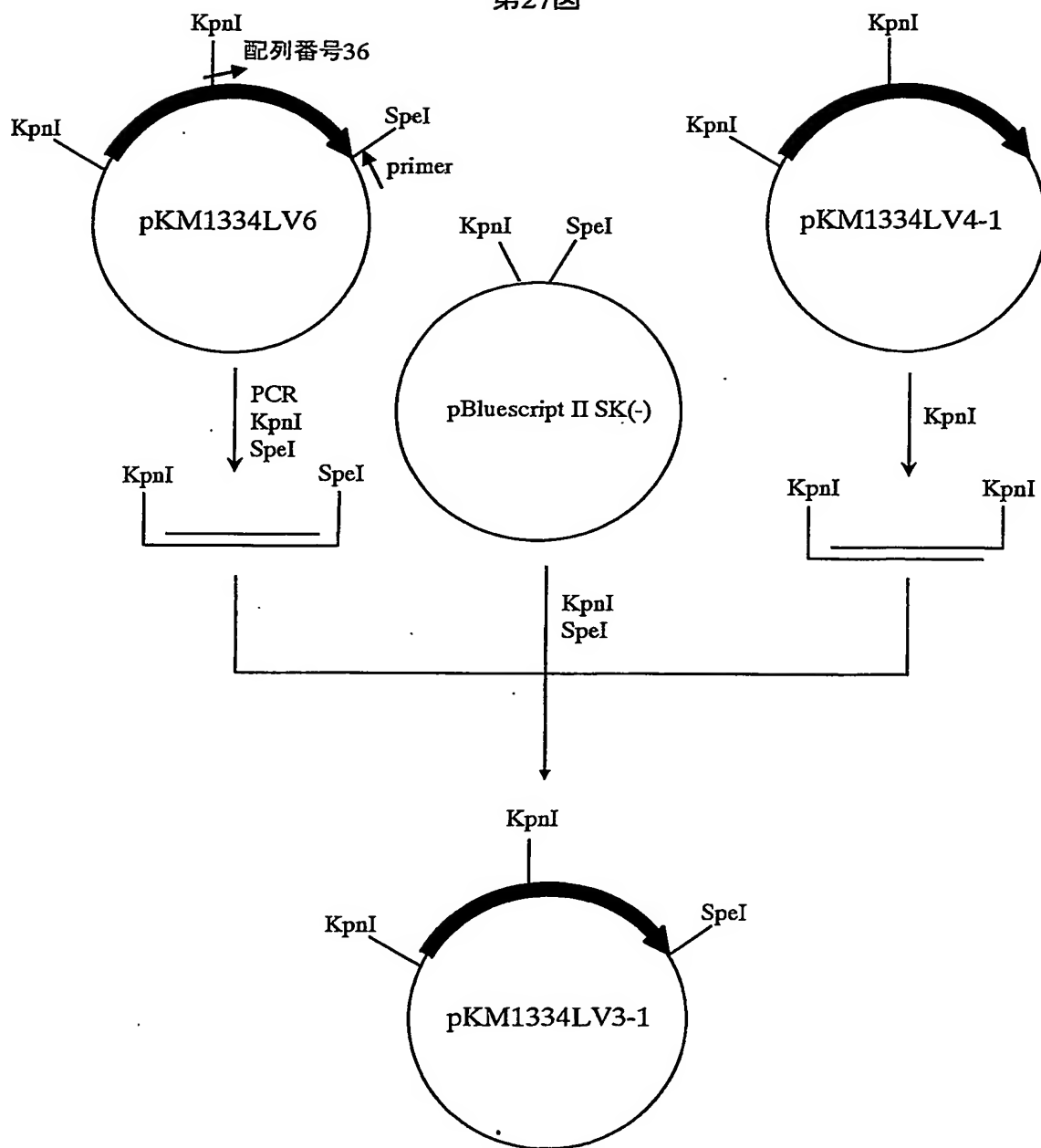
第25図



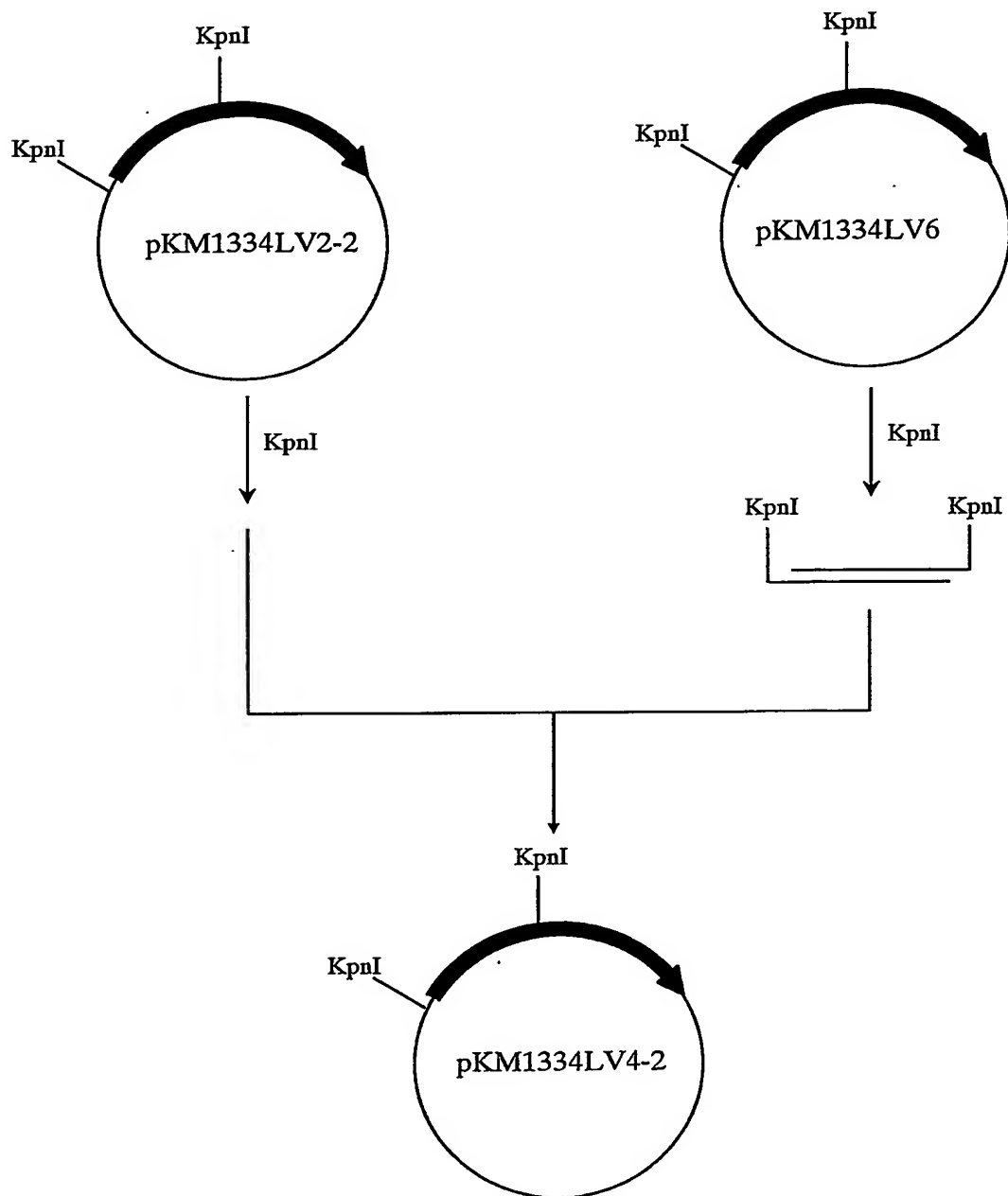
第26図



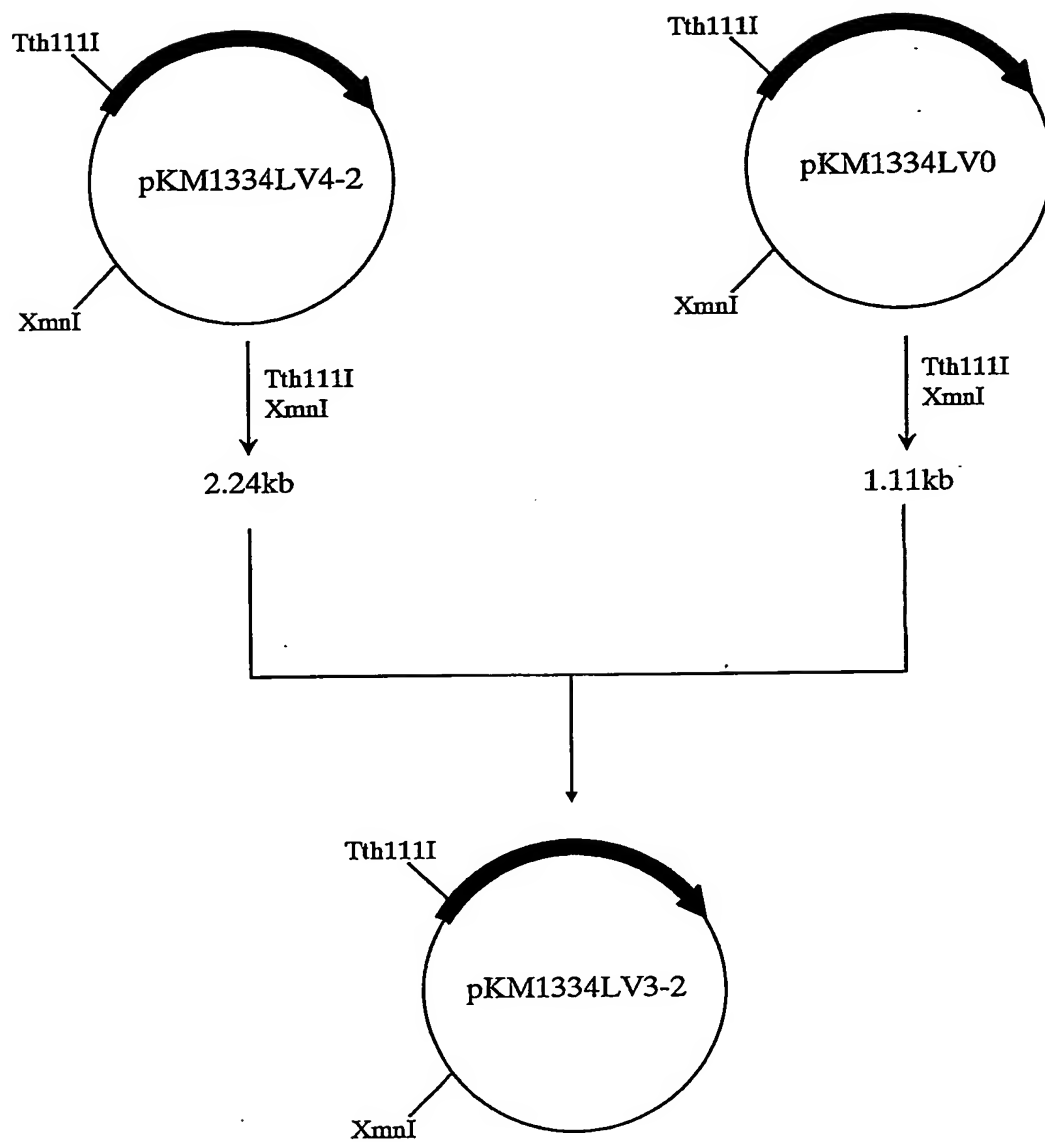
第27図



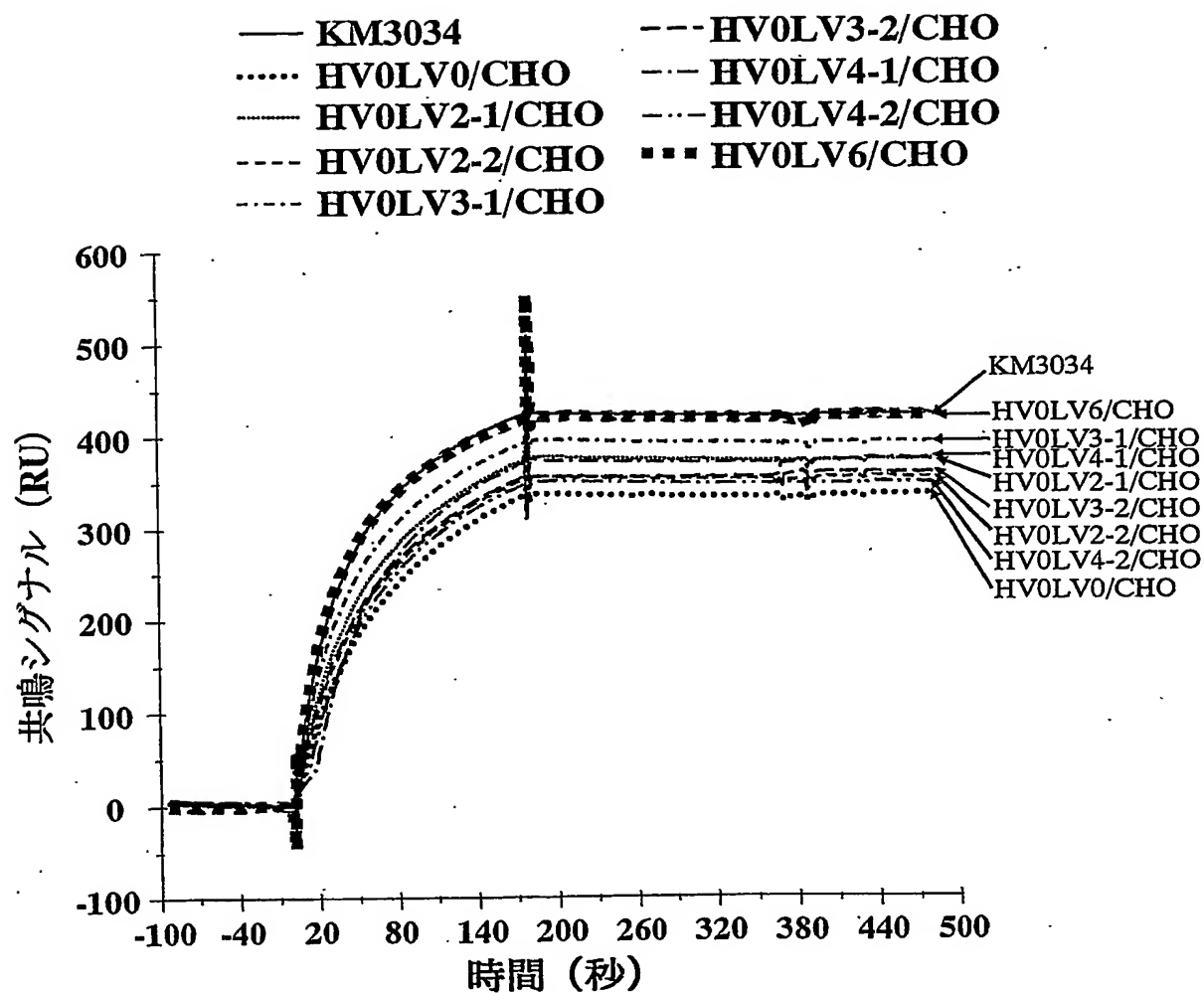
第28図



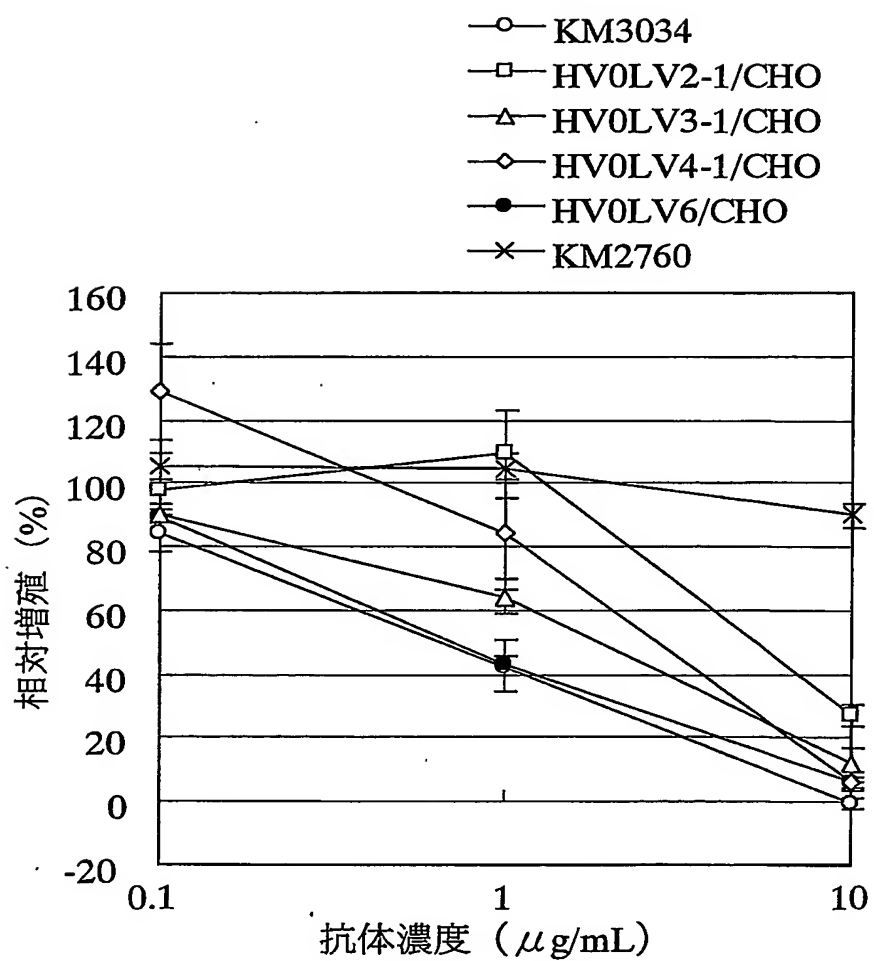
第29図



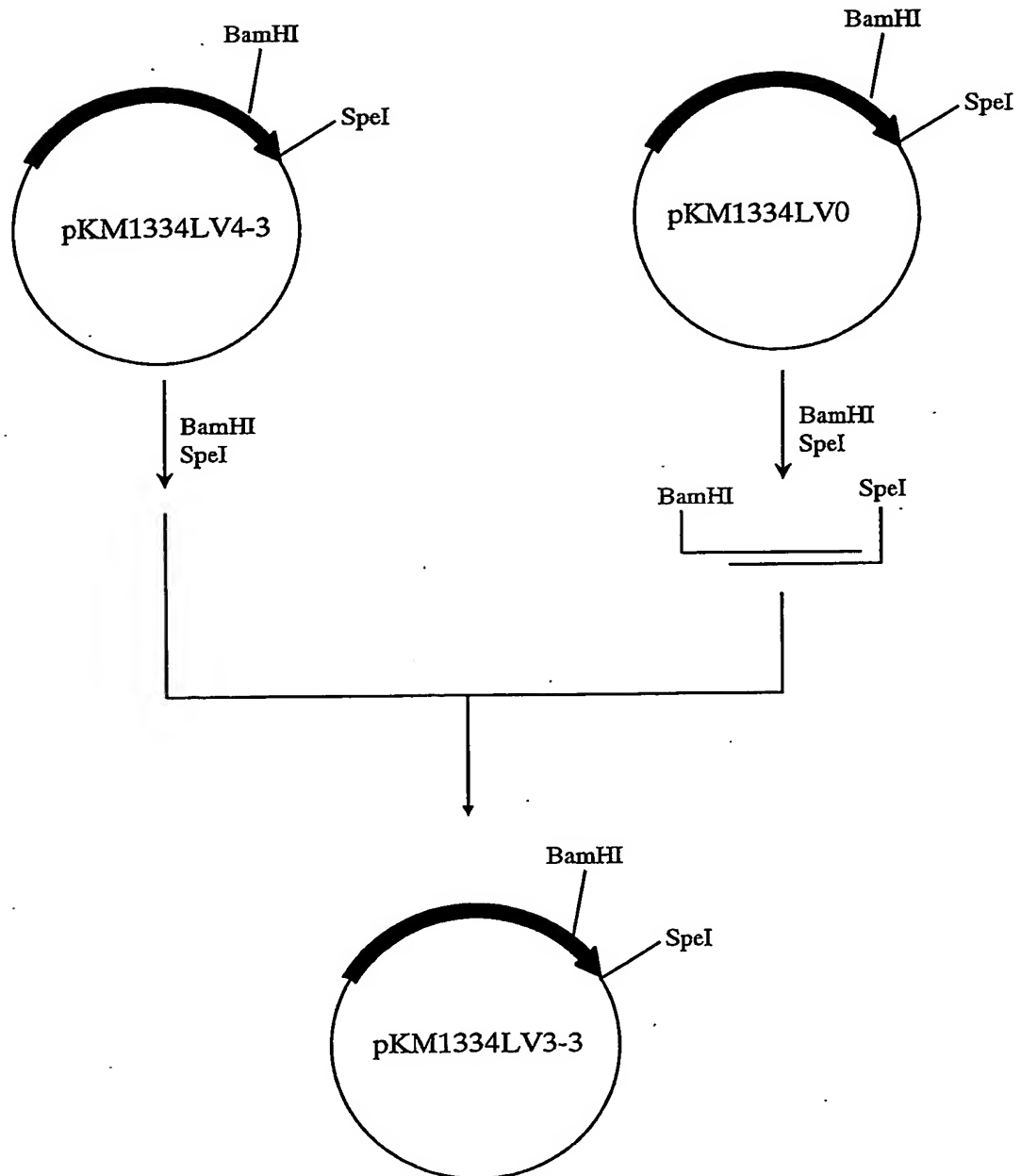
第30図



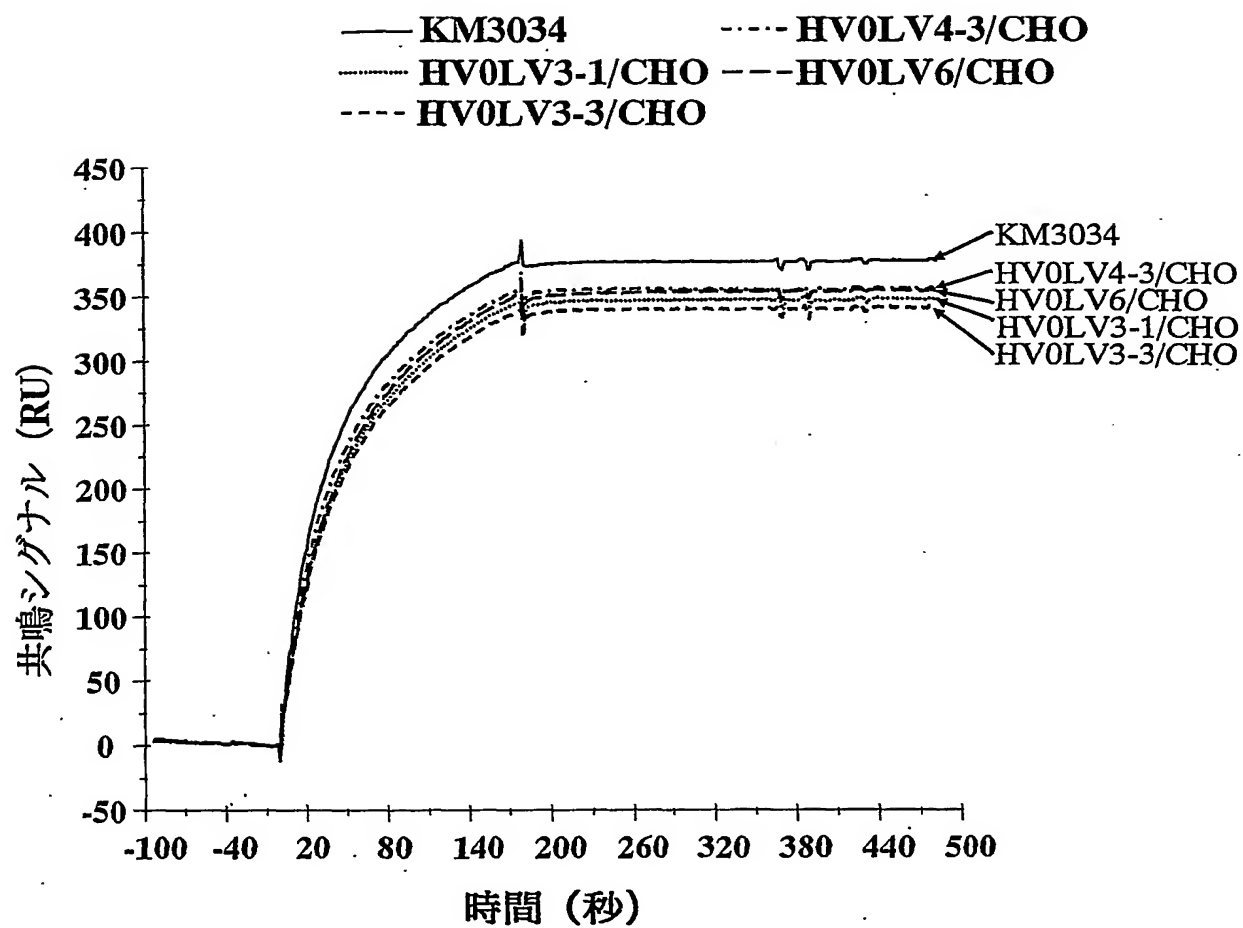
第31図



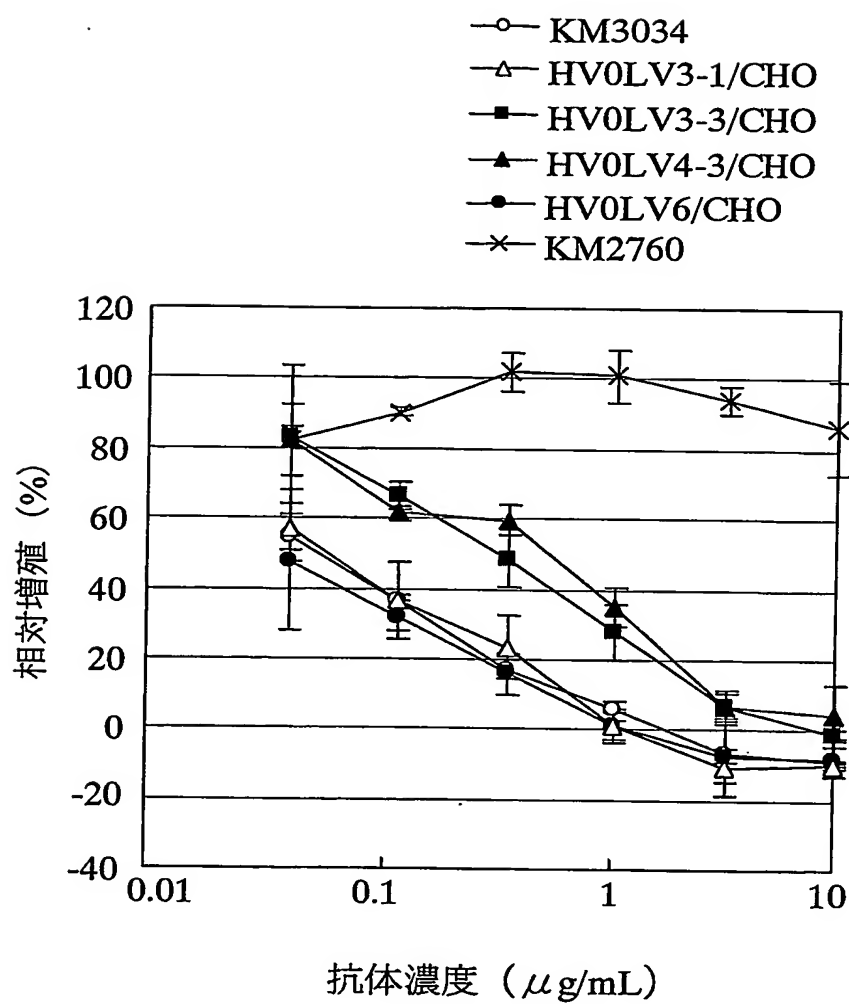
第32図



第33図



第34図



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Therapeutic agent for arthritis

<130> 1442

<150> JP2001-400677

<151> 2001-12-28

<160> 51

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 420

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> Inventor: Tamura, Tadafumi; Uchii, Masako; Toshio, Suda

Inventor: Ichiro, Miki; Akira, Tanaka

<220>

<221> source

<222> (1)..(420)

<223> /organism="Mus musculus"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(420)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<400> 1

atg gaa tgg atc tgg atc ttt ctc ttc ttc ctc tca gga act aca ggt 48

Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly

1 5 10 15

gtc tac tcc cag gtt cag ctg cag cag tct gga gct gag gtg gcg agg 96

Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg

20 25 30

ccc ggg gct tca gtg aaa ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

act gac tac tat cta aac tgg gtg aag cag agg tct gga cag ggc ctt 192

Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu

50 55 60

gag tgg att gga gag att gat cct gga agt gat agt ata tat tat aat 240

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn

65 70 75 80

gaa aac ttg gag ggc agg gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288

Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85

90

95

aca gcc tac atg cag ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100

105

110

tat ttc tgt gca aga tat ggg tat tct aga tac gac gta agg ttt gtc 384

Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val

115

120

125

tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct aca 420

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr

130

135

140

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 2

Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly

1

5

10

15

Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg

20

25

30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35

40

45

Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn

65

70

75

80

Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85

90

95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100

105

110

Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val

115

120

125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr

130

135

140

<210> 3

<211> 393

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> source

<222> (1)..(393)

<223> /organism="Mus musculus"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(393)

<220>

<221> signal_peptide

<222> (1)..(57)

<400> 3

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1

5

10

15

tcc agg agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96

Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val

20

25

30

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agt ctt 144

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu

35	40	45	
gta cat agt aat gga aga acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cct			192
Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro			
50	55	60	
ggc cag tca cca aag gtc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga att tct			240
Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser			
65	70	75	80
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca			288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr			
85	90	95	
ctc aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc			336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys			
100	105	110	
ttt cag ggt tca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg			384
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu			
115	120	125	
gaa ata aaa			393
Glu Ile Lys			
130			

<210> 4

<211> 131

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(19)

<400> 4

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys

130

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu
50 55 60

Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr

115

120

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20

25

30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly

85

90

95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Asp Tyr Tyr Leu Asn

1

5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu Glu

1

5

10

15

Gly

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr

1

5

10

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu

1

5

10

15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer for amplification of KM1334 VH

<400> 13

ctgaattcgc ggccgctagt cc

<210> 14

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer for amplification of KM1334 VH

<400> 14

atgggccctt ggtggaggct gtagagacag tgaccagag

39

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer for amplification of KM1334 VL

<400> 15

ctgaattcgc ggccgctgct gt

22

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer for amplification of KM1334 VL

<400> 16

atcgtacgtt ttatttccag cttggtcc

28

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> human FGF-8 peptide (amino acids residues 23-46) added an
cysteine residue at its C-terminus

<400> 17

Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe Thr Gln His Val Arg Glu

1

5

10

15

Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Cys

20

25

<210> 18

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> HV.0, a designed amino acid sequence of VH of
an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu
50 55 60

Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LV.0, a designed amino acid sequence of VL of
an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1

5

10

15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20

25

30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85

90

95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> HV.6, a designed amino acid sequence of VH of
an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu

50

55

60

Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 21

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LV.6, a designed amino acid sequence of VL of
an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

<400> 21

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 22

<211> 504

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a DNA encoding HV.0

<220>

<221> CDS

<222> (47)..(466)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (47)..(103)

<400> 22

caggaaacag ctatgacgaa ttcgcggccg cacactgact ctaacc atg gaa tgg 55
 Met Glu Trp

atc tgg atc ttt ctc ttc ttc ctc tca gga act aca ggt gtc tac tcc 103
 Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly Val Tyr Ser
 -15 -10 -5 -1

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag ccc ggg gcc 151
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc act gac tac 199
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

tat cta aac tgg gtg cgg cag gcc ccc gga caa ggg ctt gag tgg atg 247
Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

gga gag atc gat cct gga agt gat agt ata tat tat aat gaa aac ttg 295
Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu
50 55 60

gag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcc acg agc aca gcc tac 343
Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 391
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga tat ggg tat tct aga tac gac gta agg ttt gtc tac tgg ggc 439
Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr Trp Gly
100 105 110

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcctccacca agggcccact 486
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

agtcgtgact gggaaaac

504

<210> 23

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.0

<400> 23

caggaaacag ctatgacgaa ttcgcggccg cacactgact ctaaccatgg aatggatctg 60

gatctttctc ttcttctctc caggaaactac aggtgtctac tcccaggtgc agctggtgca 120

gtctggggct gaggtgaaga a 141

<210> 24

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.0

<400> 24

aggatcgatc tctcccatcc actcaagccc ttgtccgggg gcctgccgca cccagtttag 60
atagtagtca gtgaagggtg atccagaagc cttgcaggag accttcactg aggccccggg 120
cttcttcacc tcagccccag a 141

<210> 25

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.0

<400> 25

ggatgggaga gatcgatcct ggaagtgata gtatatatta taatgaaaac ttggagggca 60
gagtcacgat taccgcgac acatccacga gcacagccta catggagctg agcagcctga 120
gatctgagga cacggccgtg t 141

<210> 26

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.0

<400> 26

gttttcccag tcacgactag tgggcccttg gtggaggctg aggagacggt gaccagggtt 60

ccctggcccc agtagacaaa ctttacgtcg tatctagaat acccatatct cgcacagtaa 120

tacacggcgg tgtcctcaga t 141

<210> 27

<211> 504

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a DNA encoding HV.6

<220>

<221> CDS

<222> (47)..(466)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (47)..(103)

<400> 27

caggaaacag ctatgacgaa ttgcgggcgg cacactgact ctaacc atg gaa tgg 55
Met Glu Trp

atc tgg atc ttt ctc ttc ttc ctc tca gga act aca ggt gtc tac tcc 103
 Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly Val Tyr Ser
 -15 -10 -5 -1

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg gcg agg ccc ggg gcc 151
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc act gac tac 199
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

tat cta aac tgg gtg cgg cag agg tct gga caa ggg ctt gag tgg att 247
 Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga gag atc gat cct gga agt gat agt ata tat tat aat gaa aac ttg 295
 Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu
 50 55 60

gag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcc acg agc aca gcc tac 343
 Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat ttc tgt 391
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

gcg aga tat ggg tat tct aga tac gac gta agg ttt gtc tac tgg ggc 439
 Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr Trp Gly

100

105

110

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcctccacca agggcccact 486

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

agtcgtgact gggaaaac 504

<210> 28

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.6

<400> 28

caggaaacag ctatgacgaa ttcgcggccg cacactgact ctaaccatgg aatggatctg 60

gatctttctc ttcttcctct caggaactac aggtgtctac tcccaggtgc agctggtgca 120

gtctggggct gaggtggcga g 141

<210> 29

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.6

<400> 29

aggatcgatc tctccaatcc actcaagccc ttgtccagac ctctgccgca cccagtttag 60

atagtagtca gtgaagggtg atccagaagc ctgtcaggag accttcactg aggccccggg 120

cctcgccacc tcagccccag a 141

<210> 30

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.6

<400> 30

ggattggaga gatcgatcct ggaagtgata gtatatatta taatgaaaac ttggagggca 60

gagtcacgat taccggggac acatccacga gcacagccta catggagctg agcagcctga 120

gatctgagga cacggccgtg t 141

<210> 31

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding HV.6

<400> 31

gttttcccag tcacgactag tgggcccttg gtggaggctg aggagacggt gaccagggtt 60

ccctggcccc agtagacaaa ccttacgtcg tatctagaat acccatatct cgcacagaaa 120

tacacggccg tgcctcaga t 141

<210> 32

<211> 459

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a DNA encoding LV.0

<220>

<221> CDS

<222> (40)..(432)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (40)..(96)

<400> 32

caggaaacag ctatgacgaa ttcaggttgc ctctcaaa atg aag ttg cct gtt 54

Met Lys Leu Pro Val

-15

agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct tcc agg agt gat atc 102

Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg Ser Asp Ile

-10

-5

-1 1

gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga gag ccg 150

Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro

5

10

15

gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cag agt ctt gta cat agt aat gga 198

Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly

20

25

30

aga acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca cag 246

Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln

35

40

45

50

ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga att tct ggg gtc cca gac agg 294

Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro Asp Arg

55

60

65

ttc agt ggc agt gga tcc ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc agc agg 342

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg

70

75

80

gtg gag gct gag gac gtc ggg gtt tat tac tgc ttt cag ggt tca cat 390

Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His

85

90

95

gtt ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa

432

Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

cgtacgacta gtcgtgactg ggaaaac

459

<210> 33

<211> 130

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding LV.0

<400> 33

caggaaacag ctatgacgaa ttcaggttgc ctctcaaaa tgaagttgcc tgtaggctg 60

ttggtgctga tggtctggat tctgcttcc aggagtata tcgtgatgac tcagtctcca 120

ctctccctgc 130

<210> 34

<211> 130

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding LV.0

<400> 34

agactggcct ggcttctgca ggtaccattc taaatagggtt cttccattac tatgtacaag 60

actctgacta gatctgcagg agatggaggc cggctctcca ggggtgacgg gcagggagag 120

tggagactga 130

<210> 35

<211> 130

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding LV.0

<400> 35

tgcagaagcc aggccagtct ccacagctcc tgatctataa agtttccaac cgaatttctg 60

gggtcccaga caggttcagt ggcagtggat ccgggacaga tttcacactg aaaatcagca 120

gggtggaggc 130

<210> 36

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding LV.0

<400> 36

gttttcccag tcacgactag tcgtacgttt gatttccacc ttggtccctt.ggccgaacgt 60

gtacggaaca tgtgaaccct gaaagcagta ataaaccccg acgtcctcag cctccaccct 120

gctgatttt 129

<210> 37

<211> 459

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a DNA encoding LV.6

<220>

<221> CDS

<222> (40)..(432)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (40)..(96)

<400> 37

caggaaacag ctatgacgaa ttcaggttgc ctccctcaaa atg aag ttg cct gtt 54

Met Lys Leu Pro Val

-15

agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct tcc agg agt gat gtt 102

Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg Ser Asp Val

-10

-5

-1 1

gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc agt ctt gga gag ccg 150

Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Glu Pro

5

10

15

gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cag agt ctt gta cat agt aat gga 198

Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly

20

25

30

aga acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aag 246

Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys

35

40

45

50

gtc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga att tct ggg gtc cca gac agg 294

Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro Asp Arg

55

60

65

ttc agt ggc agt gga tcc ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc agc agg 342

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg

70

75

80

gtg gag gct gag gac gtc ggg gtt tat ttc tgc ttt cag ggt tca cat 390

Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly Ser His

85

90

95

gtt ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa

432

Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

120

125

130

cgtacgacta gtcgtgactg ggaaaac

459

<210> 38

<211> 130

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding LV.6

<400> 38

caggaaacag ctatgacgaa ttcaggttgc ctctcaaaa tgaagttgcc tgtaggctg 60

ttggtgctga tggtctggat tctgcttcc aggagtgatg ttgtgatgac tcagtctcca 120

ctctccctgc 130

<210> 39

<211> 130

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding LV.6

<400> 39

agactggcct ggcttctgca ggtaccattc taaatagggtt ctccattac tatgtacaag 60

actctgacta gatctgcagg agatggaggc cgctctcca agactgacgg gcagggagag 120

tggagactga 130

<210> 40

<211> 130

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding LV.6

<400> 40

tgcagaagcc aggccagtct ccaaagggtc tgatctataa agtttccaac cgaatttctg 60

gggtcccaga caggttcagt ggcagtggat ccgggacaga tttcacactg aaaatcagca 120

gggtggaggc 130

<210> 41

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic DNA for construction of a DNA encoding LV.6

<400> 41

gttttcccag tcacgactag tcgtacgttt gatttccacc ttggtccctt ggccgaacgt 60

gtacggaaca tgtgaaccct gaaagcagaa ataaaccccg acgtcctcag cctccaccct 120

gctgatttt 129

<210> 42

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LV.4-1, a designed amino acid sequence of VL of
an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

<400> 42

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1

5

10

15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 43

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LV.4-2, a designed amino acid sequence of VL of
an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

<400> 43

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 44

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LV.3-1, a designed amino acid sequence of VL of
an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

<400> 44

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly

85

90

95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LV.3-2, a designed amino acid sequence of VL of
an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

<400> 45

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20

25

30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 46

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LV.2-1, a designed amino acid sequence of VL of
an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

<400> 46

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20

25

30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly

85

90

95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 47

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LV.2-2, a designed amino acid sequence of VL of
an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

<400> 47

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 48

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer for construction of DNA encoding LV.3-1

<400> 48

atgttacctg cagaagccag gccagtctcc acaggtcct

39

<210> 49

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a primer for construction of DNA encoding LV.2-2

<400> 49

atgttacctg cagaagccag gccagtctcc acaggtcct

39

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LV.4-3, a designed amino acid sequence of VL of
an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

<400> 50

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		

Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		

Asn	Gly	Arg	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			

Pro	Gln	Val	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Ile	Ser	Gly	Val	Pro
		50					55					60			

Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75				80	

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Phe	Gln	Gly
				85					90					95	

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LV.3-3, a designed amino acid sequence of VL of
an anti-FGF-8 CDR-grafted neutralizing antibody

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

出願人又は代理人の書類記号

1 4 4 2

国際出願番号

PCT/JP 02/13650

寄託された微生物に関する表示

〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

1 5

頁、

1 1

行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号 305-8566）

寄託の日付

26.12.01

受託番号

FERM BP-7836

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない）

この情報は別紙に続いている ☐

ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

受理官庁記入欄



この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員

金井 信也

国際事務局記入欄



この用紙が国際事務局に受理された日

24 JAN 2003

権限のある職員

小山 暁子

出願人又は代理人の書類記号	1 4 4 2	国際出願番号	PCT/JP 02/13650
---------------	---------	--------	-----------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
1 7	1 8
頁、 行	
B. 寄託の表示	他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号 305-8566）	
寄託の日付 20.06.02	受託番号 FERM BP-8084
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない）	この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>
ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 金井 信也

国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 24 JAN 2003
権限のある職員 小山 暁子

出願人又は代理人の書類記号	1 4 4 2	国際出願番号	PCT/JP 02/13650
---------------	---------	--------	-----------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
1 7	2 1
頁、 行	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号 305-8566）	
寄託の日付 20.06.02	受託番号 FERM BP-8083
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
<p>ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。</p>	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 金井 信也

国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 24 JAN 2003
権限のある職員 小山 暁子

出願人又は代理人の書類記号	1 4 4 2	国際出願番号	PCT/JP 02/13650
---------------	---------	--------	-----------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
1 7	2 4
頁、	行
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号 305-8566）	
寄託の日付 20.06.02	受託番号 FERM BP-8082
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
<p>ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。</p>	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 金井 信也

国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 24 JAN 2003
権限のある職員 小山 暁子

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

協和醗酵工業株式会社

取締役社長 平田 正

寄託者

あ て 名 〃

殿

東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

KM8035

(受託番号)

FERM BP- 8082

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- ☒ 科学的性質
- ☒ 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 14 年 6 月 20 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。
そして、 年 月 日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

International Patent Organism Depositary
名 称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

センター長 岡 修

Dr. Syuichi Oka, Director

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566)
AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 Japan

平成 14 年 (2002) 6 月 20 日

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/13650

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ A61K39/395, A61P19/02, G01N33/564

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl.⁷ A61K39/395, A61P19/02, G01N33/564

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, A	WO 03/002608 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 09 January, 2003 (09.01.03), Full text (Family: none)	1-51
A	KURIHARA, Yukiko et al., Cooperation of endothelin -1 and FGF8 in Meckel's cartilage formation, Development Growth & Differentiation, 2001 Jur., Vol.43, Supplement, S109, full text	1-51
A	PRAUL, Craig A. et al., Effect of fibroblast growth factors 1,2,4,5,6,7,8,9 and 10 on avian chondrocyte proliferation, Journal of Cellular Biochemistry, 2001 Oct., Vol.84, No.2, pages 359 to 366, full text	1-51

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 20 March, 2003 (20.03.03)	Date of mailing of the international search report 08 April, 2003 (08.04.03)
--	---

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP02/13650

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 799835 A2 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 08 October, 1997 (08.10.97), Full text & JP 9-271391 A	1-51
A	WO 00/62809 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 26 October, 2000 (26.10.00), Full text & EP 1174149 A1	1-51
A	EP 882794 A2 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 09 December, 1998 (09.12.98), Full text & JP 10-257893 A	1-51
A	JP 2001-46066 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 20 February, 2001 (20.02.01), Full text (Family: none)	1-51

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K39/395, A61P19/02, G01N33/564

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K39/395, A61P19/02, G01N33/564

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)	BIOSIS (STN)
REGISTRY (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
E A	WO 03/002608 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2003. 01. 09, 全文 (ファミリーなし)	1-51
A	KURIHARA, Yukiko <i>et al</i> , Cooperation of endothelin-1 and FGF8 in Meckel's cartilage formation, Development Growth & Differentiation, 2001 Jur., Vol. 43, Supplement, S109, 全文	1-51

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 03. 03

国際調査報告の発送日

08.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希



4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	PRAUL, Craig A. <i>et al</i> , Effect of fibroblast growth factors 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10 on avian chondrocyte proliferation, Journal of Cellular Biochemistry, 2001 Oct., Vol. 84, No. 2, pp359-366, 全文	1-51
A	EP 799835 A2 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 1997. 10. 08, 全文 & JP 9-271391 A	1-51
A	WO 00/62809 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2000. 10. 26, 全文 & EP 1174149 A1	1-51
A	EP 882794 A2 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 1998. 12. 09, 全文 & JP 10-257893 A	1-51
A	JP 2001-46066 A (協和醗酵工業株式会社) 2001. 02. 20, 全文 (ファミリーなし)	1-51